

Produktion rekombinanter Antikörperfragmente in *Bacillus megaterium*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Eva Grazyna Jordan
aus Gdingen / Polen

1. Referent:	Professor Dr. Stefan Dübel
2. Referent:	Professor Dr. Dieter Jahn
eingereicht am:	16.07.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am:	19.11.2008

Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Jordan, E., Al-Halabi, L., Schirrmann, T. & Hust, M.: Antibody production by the gram-positive bacterium *Bacillus megaterium*. *Methods in Molecular Biology*, in Druck.

Jordan, E., Al-Halabi, L., Schirrmann, T., Hust, M. & Dübel, S.: Production of single chain Fab (scFab) fragments in *Bacillus megaterium*. *Microbial Cell Factories* 6:38 (2007).

Jordan, E., Hust, M., Roth, A., Biedendieck, R., Schirrmann, T., Jahn, D. & Dübel, S.: Production of recombinant antibody fragments in *Bacillus megaterium*. *Microbial Cell Factories* 6:2 (2007).

Biedendieck, R., Beine, R., Gamer, M., Jordan, E., Buchholz, K., Seibel, J., Dijkhuizen, L., Malten, M. & Jahn, D.: Export, purification, and activities of affinity tagged *Lactobacillus reuteri* levansucrase produced by *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 1062-1073 (2007).

Tagungsbeiträge

Jordan, E., El-Ghezal, A., Hust, M. & Dübel, S.: Recombinant antibodies: Expression in *Bacillus megaterium* and *Aspergillus niger*. (Poster) Braunschweig Antibody Workshop (2006).

Hust, M., Jordan E., Al-Halabi, L., Jostock, T., Menzel, C., Vödisch, B., Mohr, A., Brenneis, M., Kirsch, M., Meier, D., Schirrmann, T. & Dübel, S.: Single chain Fab fragments (scFab). (Poster) IBC's 18th Annual International Conference Antibody Engineering, San Diego, USA (2007).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Antikörper	1
1.2	Antikörperfragmente	3
1.3	Produktion rekombinanter Antikörper und Antikörperfragmente	4
1.4	<i>Bacillus megaterium</i>	6
1.5	Ein Xylose-induzierbares Promotorsystem aus <i>Bacillus megaterium</i>	7
1.6	Translokation von Proteinen durch die Cytoplasmamembran von grampositiven Bakterien	9
1.7	Produktion und Sekretion von rekombinanten Proteinen in <i>B. megaterium</i>	12
1.8	Zielsetzung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	14
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	14
2.1.2	Geräte	14
2.2	Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Kit-Systeme	15
2.2.1	Chemikalien	15
2.2.2	Enzyme	15
2.2.3	Antikörper	16
2.2.4	Kit-Systeme	16
2.2.5	Sonstiges	16
2.3	Puffer und Lösungen	17
2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock nach der Rubidium-Chlorid-Methode	17
2.3.2	Transformation von <i>B. megaterium</i>	17
2.3.3	Präparation von Plasmid-DNA	18
2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	18
2.3.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18
2.3.6	Coomassiefärbung von Proteinen	19
2.3.7	Immunoblot	19
2.3.8	Antigen-ELISA	20
2.3.9	Periplasmapräparation	20
2.3.10	Aufreinigung von Antikörperfragmenten mittels <i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i> (IMAC)	21
2.4	Nährmedien und Zusätze	21
2.4.1	Nährmedien	21
2.4.2	Zusätze	22
2.5	Bakterienstämme und Plasmide	23
2.5.1	Bakterienstämme	23
2.5.2	Plasmide	23
2.6	Oligonukleotide	24
2.7	Computerprogramme	26
2.8	Mikrobiologische Techniken	26
2.8.1	Sterilisation	26
2.8.2	Bakterienkultivierung	27
2.8.3	Plattenkulturen von Bakterien	27
2.8.4	Flüssigkulturen von Bakterien	27

2.8.5	Bestimmung von Zelldichten	27
2.8.6	Lagerung von Bakterien	28
2.8.7	Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock nach der Rubidium-Chlorid-Methode	28
	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	28
	Transformation	28
2.8.8	Transformation von <i>B. megaterium</i>	29
	Protoplastenherstellung	29
	Präzipitation von Plasmid-DNA	29
	Transformation	29
2.8.9	Produktion von Antikörperfragmenten in <i>B. megaterium</i>	30
2.8.10	Produktion von Antikörperfragmenten in <i>E. coli</i>	30
2.9	Molekularbiologische Techniken	30
2.9.1	Präparation von Plasmid-DNA	30
2.9.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	31
2.9.3	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.9.4	Codon usage-Optimierung	31
2.9.5	Hybridisierung von Oligonukleotiden	32
2.9.6	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion	32
2.9.7	Generierung von A-Überhängen an DNA-Fragmenten	34
2.9.8	Reinigung von DNA-Fragmenten	35
2.9.9	Restriktion von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	35
2.9.10	Dephosphorylierung endständiger 5'-DNA-Phosphatgruppen	35
2.9.11	Ligation von DNA-Fragmenten	36
2.9.12	TOPO TA-Klonierung	36
2.9.13	DNA-Sequenzierung	37
2.10	Proteinbiochemische Methoden	38
2.10.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.10.2	Coomassiefärbung von Proteinen	38
2.10.3	Immunoblot	38
	Western-Blot	38
	Immunfärbung	39
2.10.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	39
2.10.5	Densitometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	39
2.10.6	Antigen-ELISA	40
2.10.7	Periplasmapräparation	41
2.10.8	Präzipitation von Proteinen mit Ammoniumsulfat	41
2.10.9	Dialyse von proteinhaltigen Lösungen	41
2.10.10	Aufreinigung von Antikörperfragmenten mittels Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC)	41
	Beladen der Sepharosematrix mit Nickelionen	42
	IMAC	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Konstruktion der <i>B. megaterium</i> -Expressionsvektoren	43
3.1.1	Konstruktion des Vektors pEJBmopSplipA	43
3.1.2	Konstruktion der Vektoren pEJBmD1.3scFv und pEJBmLA13-IIIE3scFv	43
3.1.3	Konstruktion des Vektors pEJBmD1.3scFab Δ C	45
3.2	Optimierung der Parameter für die D1.3 scFv-Produktion in <i>B. megaterium</i>	46
3.2.1	Optimierung der Produktionstemperatur (LB-Medium)	46
3.2.2	Optimierung der Produktionsdauer (LB-Medium)	48

3.2.3	Optimierung des Mediums	50
3.2.4	Optimierung der Produktionsdauer (TB-Medium)	51
3.2.5	Optimierung der Produktionstemperatur (TB-Medium)	53
3.3	Vergleich der Produktion des D1.3 scFv in <i>B. megaterium</i> und <i>E. coli</i>	55
3.4	Produktion des LA13-IIE3 scFv in <i>B. megaterium</i> und <i>E. coli</i>	57
3.4.1	Produktion des LA13-IIE3 scFv in <i>B. megaterium</i>	57
3.4.2	Vergleich der Produktion des LA13-IIE3 scFv in <i>B. megaterium</i> und <i>E. coli</i>	59
3.5	Produktion des D1.3 scFab Δ C in <i>B. megaterium</i> und <i>E. coli</i>	62
3.5.1	Produktion des D1.3 scFab Δ C in <i>B. megaterium</i>	62
3.5.2	Vergleich der Produktion des D1.3 scFab Δ C in <i>B. megaterium</i> und <i>E. coli</i>	63
4	Diskussion	67
4.1	Konstruktion der <i>B. megaterium</i> -Expressionsvektoren	67
4.2	Optimierung der Parameter für die D1.3 scFv-Produktion in <i>B. megaterium</i>	68
4.3	Produktion von scFv-Fragmenten in <i>B. megaterium</i>	71
4.4	Produktion des D1.3 scFab Δ C in <i>B. megaterium</i>	73
4.5	Ausblick	74
5	Zusammenfassung	76
5	Summary	77
6	Literaturverzeichnis	78
7	Danksagung	91
8	Lebenslauf	92

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A _x	Absorption bei einer Wellenlänge von x nm
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische-Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CcpA	<i>catabolite control protein</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
C _H	konstante Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
CHO-Zellen	<i>chinese hamster ovary cells</i>
CIP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
C _L	konstante Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
Clm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
COS-Zellen	Affennierenzellen
<i>cre</i>	<i>catabolite responsive element</i>
CRP	Capsel-reaktives Protein
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
DsrS	Dextran sucrase von <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
f.	<i>forward</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
Ffh	<i>fifty four homolog</i>
Fv	<i>fragment variable</i>
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HEK293T-Zellen	<i>human embryonic kidney cells</i>
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria-Bertani (Medium)
LipA	extrazelluläre Lipase aus <i>Bacillus megaterium</i>
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
n	Anzahl der Basen eines Oligonukleotids
N	Normal
NBT	Nitroblue Tetrazolium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
O _L	Operator des <i>xylABT</i> -Operons
O _R	Operator des <i>xylABT</i> -Operons
P	Promotor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PPP	Periplasmapräparation
PVDF	Polyvinylidendifluorid
r.	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
s	Sekunde
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
scIgG	<i>single chain</i> Immunglobulin G
scFab	<i>single chain fragment antigen binding</i>
scFv	<i>single chain fragment variable</i>
scRNA	<i>small cytoplasmic RNA</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SipM	TypI Signalpeptidase aus <i>Bacillus megaterium</i>
SP	Signalpeptid
SRP	<i>signal recognition particle</i>
T	Thymin
TA	Thymin-Adenin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin

T _M	theoretische Hybridisierungstemperatur
TMB	Tetramethylbenzidin
TOPO	Topoisomerase I
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TY	Trypton- Yeast (Medium)
U	<i>unit</i>
UV	ultra-violett
V	Volt
V _H	variable Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
V _L	variable Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
xg	Erdschwerebeschleunigung
XylA	Xylose-Isomerase
XylB	Xylulo-Kinase
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
xy/O	Operatorregion des <i>xylABT</i> -Operons
XylR	Repressorprotein des <i>xylABT</i> -Operons
XylT	Xylose-Permease
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Antikörper

Antikörper, auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet, sind wichtige Proteine der adaptiven Immunantwort von Wirbeltieren. Sie binden spezifisch an Fremdsubstanzen (Antigene) und mobilisieren Zellen und Moleküle des Immunsystems, die diese Fremdsubstanz zerstören. Man unterscheidet beim Menschen fünf verschiedene Klassen von Antikörpern: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Antikörper werden von B-Zellen produziert, wobei jede B-Zelle einen Antikörper mit einer einzigen Spezifität synthetisiert, der membrangebunden als B-Zell-Rezeptor vorliegen kann oder bei ausdifferenzierten B-Zellen (Plasmazellen) sezerniert wird. Die verschiedenen Klassen von Antikörpern unterscheiden sich in ihren funktionellen Eigenschaften. Diese umfassen die Neutralisierung, die Aktivierung des Komplementsystems, die Bindung an Zellen des Immunsystems und den Transfer durch das Epithel oder die Plazenta. Eine B-Zelle kann jedoch nach einem Antigen-Stimulus unter Beibehaltung der Antigenspezifität die Klasse des Antikörpers von IgM oder IgD zu IgG, IgA oder IgE wechseln (Edelman, 1973, Breitling & Dübel, 1997, Janeway *et al.*, 2002).

IgG-Antikörper, die häufigste Antikörperklasse im Blutplasma, sind Heterotetramere, die aus jeweils zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Polypeptidketten bestehen. Die relative Molekülmasse beträgt ca. 150 kDa, wobei je 50 kDa auf die beiden schweren Ketten und je 25 kDa auf die beiden leichten Ketten entfallen. Die schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Jede leichte Kette ist ebenfalls durch eine Disulfidbrücke mit einer schweren Kette verknüpft, so dass eine Y-förmige Struktur entsteht (Abb. 1) (Edelman & Poulik, 1961, Gottlieb *et al.*, 1968, Edelman *et al.*, 1969, Edelman, 1973, Janeway *et al.*, 2002).

In Antikörpern kommen zwei verschiedene Typen von leichten Ketten vor, die als λ - und κ -Ketten bezeichnet werden. Das Verhältnis von κ - zu λ -Ketten beträgt beim Menschen 2:1. Die Klasse eines Antikörpers und damit seine funktionellen Eigenschaften werden durch den Typ der schweren Kette bestimmt. Es gibt fünf

verschiedene Typen von schweren Ketten, die mit μ (IgM), δ (IgD), γ (IgG), α (IgA) und ϵ (IgE) bezeichnet werden (Edelman, 1973, Janeway *et al.*, 2002).

Antikörper binden ein spezifisches Antigen mit ihren variablen Regionen (*fragment variable*, Fv), die sich aus den aminoterminalen variablen V-Domänen der schweren und leichten Ketten (V_H bzw. V_L) zusammensetzen. Die schweren Ketten eines IgG besitzen außerdem drei konstante C-Domänen (C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}), während die leichten Ketten nur eine C-Domäne (C_L) aufweisen. Die C-Domänen der schweren und leichten Ketten bilden zusammen die konstante Region. Zwischen den Domänen C_{H1} und C_{H2} befindet sich eine flexible Gelenkregion (*hinge-Region*). Durch proteolytischen Verdau mit dem Enzym Papain wird ein IgG-Antikörper in drei Fragmente gespalten. Die zwei identischen Fab-Fragmente (*fragment antigen binding*) enthalten die antigenbindende Aktivität und setzen sich aus den vollständigen leichten Ketten und den V_H - und C_{H1} -Domänen der schweren Ketten zusammen. Das dritte Fragment vermittelt die Effektorfunktionen und besteht aus den C_{H2} - und C_{H3} -Domänen der schweren Ketten. Es wird als Fc-Fragment (*fragment crystallizable*) bezeichnet (Abb. 1) (Porter, 1959, Gottlieb *et al.*, 1968, Cunningham *et al.*, 1969, Edelman *et al.*, 1969, Inbar *et al.*, 1972, Edelman, 1973, Harris *et al.*, 1992, Janeway *et al.*, 2002).

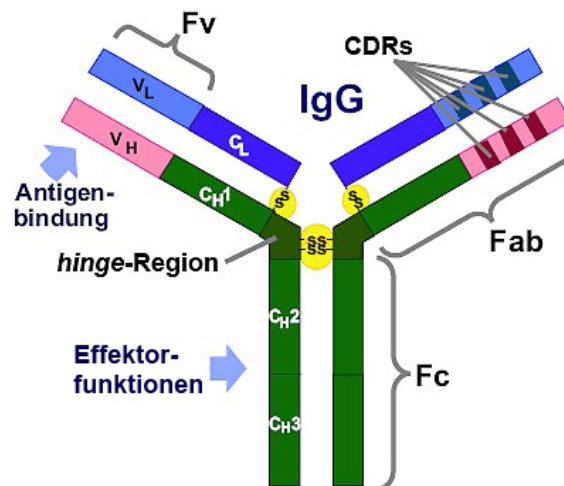


Abb. 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers. Die leichten Ketten sind blau, die schweren Ketten rosa/grün dargestellt. V_L : variable Domäne der leichten Kette, V_H : variable Domäne der schweren Kette, C_L : konstante Domäne der leichten Kette, C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} : konstante Domänen der schweren Kette, CDRs: hypervariable Regionen der variablen Domänen, -SS-: Disulfidbrücke, Abbildung: S. Dübel (modifiziert).

Die V-Domänen bestehen aus vier Gerüstregionen und aus drei hypervariablen Regionen. Die Gerüstregionen bilden β -Faltblätter und dienen der strukturellen Stabilität der V-Domäne. Die hypervariablen Regionen, auch als CDRs (*complementarity determining regions*) bezeichnet, bilden drei Schleifen, die im gefalteten Protein nebeneinander liegen und die Antigenbindestelle bilden. Die Oberflächenstruktur dieser Antigenbindestelle ist zum Antigen komplementär. Die Bindung zwischen der Antigenbindestelle und Antigen erfolgt über ionische, hydrophobe und Van-der-Waals-Kräfte, sowie Wasserstoffbrücken (Wu & Kabat, 1970, Janeway *et al.*, 2002).

1.2 Antikörperfragmente

Für viele Anwendungen wird nur die antigenbindende Aktivität des Antikörpers benötigt, so dass auf den Fc-Teil verzichtet werden kann. In manchen Fällen sind kleinere Moleküle sogar von Vorteil, da sie z. B. tiefer in einen soliden Tumor eindringen können (Breitling & Dübel, 1997). Es existieren verschiedene Formate von Antikörperfragmenten. Das Fab-Fragment (Abb. 2) kann durch proteolytischen Verdau eines Antikörpers mit dem Enzym Papain hergestellt werden (Porter, 1959, Janeway *et al.*, 2002).

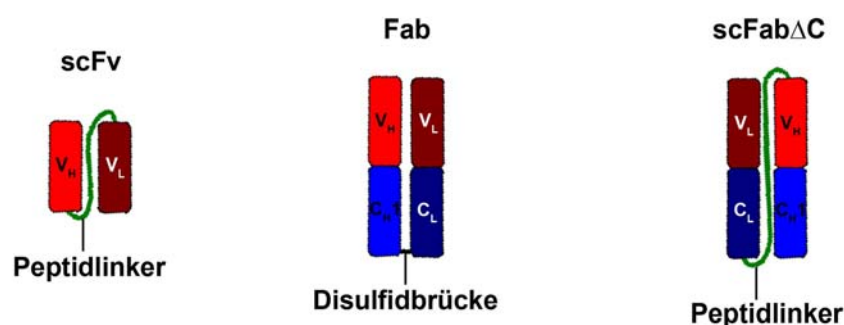


Abb. 2: Schematische Darstellung eines scFv-, Fab- und scFab Δ C-Fragments. V_L : variable Domäne der leichten Kette, V_H : variable Domäne der schweren Kette, C_L : konstante Domäne der leichten Kette, C_H1 : erste konstante Domäne der schweren Kette, Abbildung: M. Hust (modifiziert).

Mit Hilfe der Gentechnik können aber noch kleinere Fragmente mit antigenbindenden Eigenschaften rekombinant hergestellt werden. Das scFv-

Fragment (*single chain fragment variable*) besitzt eine relative Molekülmasse von 25 – 30 kDa und setzt sich aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette, die durch einen Peptidlinker von 15 – 25 Aminosäuren fusioniert sind, zusammen (Abb. 2) (Bird *et al.*, 1988, Huston *et al.*, 1988). Diese scFv-Fragmente zeigen jedoch eine stärkere Tendenz Aggregate zu bilden und sind über einen längeren Zeitraum relativ instabil (Kortt *et al.*, 1997, Arndt *et al.*, 1998, Le Gall *et al.*, 1999, Kramer *et al.*, 2002). Außerdem besitzen manche scFvs verglichen mit den entsprechenden Fab-Fragmenten eine reduzierte Affinität (Bird & Walker, 1991). Nur in seltenen Fällen wurden scFv-Fragmente mit einer höheren Affinität gefunden (Iliades *et al.*, 1998). Fab-Fragmente haben aber den Nachteil, dass sie die doppelte molare Masse von scFv-Fragmente besitzen und zwei verschiedene Polypeptidketten durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden werden müssen. Aus diesen Gründen ist die Faltung und Zusammenlagerung von Fab-Fragmenten im Periplasma von *Escherichia coli* weniger effizient als bei scFvs (Plückthun, 1990, Plückthun, 1991). Der Vorteil von Fab-Fragmenten ist ihre höhere Stabilität (Kramer *et al.*, 2002). Durch die konstanten Domänen haben Fab-Fragmente außerdem den Vorteil, dass sie mit preiswerten Antisera bzw. polyklonalen Sekundär-Antikörpern nachgewiesen werden können (Kramer *et al.*, 2002). Das scFab Δ C-Fragment (*single chain fragment antigen binding*) vereinigt die Vorteile von scFv- und Fab-Fragmenten. Die beiden Polypeptidketten eines Fab-Fragmentes sind hier mit einem Peptidlinker von 34 Aminosäuren verbunden. Die Cysteine, die die Disulfidbrücke zwischen den Polypeptidketten bilden, fehlen in diesem Antikörperfragment, wodurch die Produktion in *E. coli* verbessert werden konnte (Abb. 2) (Hust *et al.*, 2007).

1.3 Produktion rekombinanter Antikörper und Antikörperfragmente

Die Produktion von rekombinanten Antikörpern und Antikörperfragmenten stellt eine besondere Herausforderung dar, da es sich um Proteine mit Disulfidbrücken handelt, bei denen die Sekretion und Faltung häufig der limitierende Schritt ist. Für die Produktion von vollständigen Antikörpermolekülen mit den entsprechenden

Glykosylierungen werden aus diesem Grund eukaryotische Zellen verwendet. Im Körper werden Antikörper von Plasmazellen produziert. Diese lassen sich aber *in vitro* nicht unbegrenzt kultivieren. Deshalb werden Plasmazellen mit Tumorzellen fusioniert. Diese Hybridomazellen wurden für die Produktion von monoklonalen Antikörpern eingesetzt (Köhler & Milstein, 1975). Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente konnten in anderen Säugetierzellarten, wie z. B. COS- (Affennierenzellen) (Ames *et al.*, 1995, Jost *et al.*, 1996), CHO- (*chinese hamster ovary cells*) (Mack *et al.*, 1995) und HEK293T-Zellen (*human embryonic kidney cells*) (Jostock *et al.*, 2004) erfolgreich hergestellt werden.

Neben Säugerzellen eignen sich aber auch andere eukaryotische Systeme, wie z. B. Insektenzellen (Nesbit *et al.*, 1992, Abrams *et al.*, 1994, Carayannopoulos *et al.*, 1994, Hu *et al.*, 1995, Kretzschmar *et al.*, 1996), Pflanzen (Firek *et al.*, 1993, Bruyns *et al.*, 1996, Schouten *et al.*, 1996, Twyman *et al.*, 2003), Hefen (Horwitz *et al.*, 1988, Davis *et al.*, 1991, Edqvist *et al.*, 1991, Ridder *et al.*, 1995, Li *et al.*, 2006) oder filamentöse Pilze (Nyyssonen *et al.*, 1993, Keranen & Penttilä, 1995) als Produzenten für Antikörper und Antikörperfragmente.

Die Produktion von rekombinanten Antikörpern in eukaryotischen Zellen ist jedoch kosten- und/oder zeitintensiv. Prokaryotische Zellen können eine kostengünstige Alternative zu eukaryotischen Zellen sein. Das gramnegative Bakterium *E. coli* ist ein etablierter Produzent von Antikörperfragmenten. Die Antikörperfragmente werden in den von der äußeren Membran begrenzten periplasmatischen Raum von *E. coli* sekretiert und müssen aus diesem aufgereinigt werden (Skerra & Plückthun, 1988), denn nur im oxidierenden Milieu des periplasmatischen Raums können Antikörperfragmente korrekt gefaltet werden (Plückthun, 1991). In manchen Fällen werden Antikörperfragmente zusätzlich auch ins umgebende Medium freigesetzt, da die äußere Membran nach der Induktion der Produktion permeabel wird (Plückthun, 1991). Es konnten viele verschiedene Formate von Antikörperfragmenten, wie z. B. scFv- (Dübel *et al.*, 1992), Fab- (Skerra, 1994) und scFab-Fragmente (Hust *et al.*, 2007), in *E. coli* hergestellt werden. Je größer und komplexer die Antikörperfragmente sind, desto schlechter werden sie aber in *E. coli* produziert (Plückthun, 1990). Komplette Antikörper konnten nur in Einzelfällen hergestellt werden (Simmons *et al.*, 2002).

Alternative prokaryotische Antikörperproduzenten sind grampositive Bakterien. Durch das Fehlen einer äußeren Membran werden in grampositiven Bakterien produzierte Antikörperfragmente direkt in das umgebende Medium sekretiert. So ist es gelungen scFv-Fragmente erfolgreich in *Bacillus subtilis* herzustellen (Wu *et al.*, 1993, Wu *et al.*, 1998, Wu *et al.*, 2002). In *Bacillus brevis* konnten neben scFv-Fragmenten (Shiroza *et al.*, 2003) auch Fab-Fragmente produziert werden (Inoue *et al.*, 1997). Außerdem konnte *Streptomyces lividans* erfolgreich zur Produktion von Fv-Fragmenten eingesetzt werden (Ueda *et al.*, 1993). Bisher konnten sich aber grampositive Bakterien nicht gegen das etablierte Produktionssystem *E. coli* durchsetzen, da mit diesem System wesentlich mehr Erfahrungen vorliegen.

Ein Nachteil von allen beschriebenen prokaryotischen Produktionswirten ist die fehlende Glykosylierung der produzierten Antikörper. Dies beeinflusst die Effektorfunktionen, wodurch in prokaryotischen Zellen produzierte Antikörper einen begrenzten Anwendungsbereich haben. Sie können für bestimmte Anwendungen in Forschung und Diagnostik verwendet werden, wenn keine Effektorfunktionen und keine Glykosylierungen benötigt werden (Plückthun, 1991).

1.4 *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium ist ein sporenbildendes, grampositives Bakterium der Gattung *Bacillus*, in die auch *B. subtilis* eingeordnet wird. Genetisch betrachtet ist es aber weniger mit *B. subtilis* verwandt als z. B. *B. licheniformis* oder *B. cereus*. Seinen Namen hat *B. megaterium* durch die Größe seiner Zellen von über 1 µm Breite erhalten. Durch diese enorme Größe der Zellen und Sporen eignet sich *B. megaterium* besonders für morphologische Untersuchungen. Obwohl es als Bodenbakterium betrachtet wird, kommt es in vielen anderen Umgebungen vor, wie z. B. Reis, getrockneten Lebensmitteln, Meerwasser, Sedimenten, Fisch und sogar Bienenhonig (Vary, 1994).

Von ökonomischer Bedeutung ist *B. megaterium* als Produzent von kommerziell wichtigen Enzymen, wie z. B. Amylasen, sowie als Produzent von Vitamin B₁₂ (Vary, 1994).

In der Vergangenheit konnte aber auch gezeigt werden, dass *B. megaterium* viele Vorteile als Produktionswirt von heterologen, rekombinanten Proteinen besitzt. Zum einen weist *B. megaterium* eine sehr gute Proteinsekretionskapazität auf und ist nicht pathogen. Im Gegensatz zu gramnegativen Bakterien, wie *E. coli*, verfügt *B. megaterium* über keine Endotoxine in seiner Zellwand. Außerdem kann es auf vielen verschiedenen, preiswerten Substraten wachsen. Im Gegensatz zum etablierten Bakterium *B. subtilis* besitzt *B. megaterium* nur eine relevante extrazelluläre Protease und es existieren Stämme (z. B. MS941, Wittchen & Meinhard, 1995), die defizient in dieser Protease sind. Weiterhin verfügt *B. megaterium* über eine sehr hohe Plasmidstabilität (Vary, 1994). Zudem existieren ein Protoplasten-Transformationssystem und Plasmide, die für molekularbiologische Anwendungen essentiell sind (Rygus & Hillen, 1991, Barg *et al.*, 2005, Malten *et al.*, 2005a, Malten *et al.*, 2006).

1.5 Ein Xylose-induzierbares Promotorsystem aus *Bacillus megaterium*

Der Xylose-induzierbare Promotor P_{xylA} von *B. megaterium* ist der Promotor des *xylABT*-Operons, welches die Xylose-Isomerase XylA, die Xylulo-Kinase XylB und die Xylose-Permease XylT kodiert. XylA und XylB setzen Xylose über Xylulose zu Xylulose-5-Phosphat um, während XylT für den Transport von Xylose in die Zelle verantwortlich ist. Das Gen des Repressorproteins XylR befindet sich in entgegengesetzter Leserichtung dem *xylA*-Gen vorgelagert (Abb. 3) (Rygus *et al.*, 1991, Dahl *et al.*, 1994, Schmiedel *et al.*, 1997).

In Abwesenheit von Xylose bindet das Repressorprotein XylR an die Operatorregion *xylO* des *xylA*-Promotors, die aus den zwei überlappenden Operatoren O_L und O_R besteht, wodurch die Transkription des *xylABT*-Operons verhindert wird. Bei Anwesenheit von Xylose bindet diese an XylR, was zu einer Konformationsänderung dieses Repressorproteins führt. XylR kann nicht mehr an die Operatorregion binden und eine Transkription des Operons findet statt (Abb. 3) (Dahl *et al.*, 1994, Dahl *et al.*, 1995).

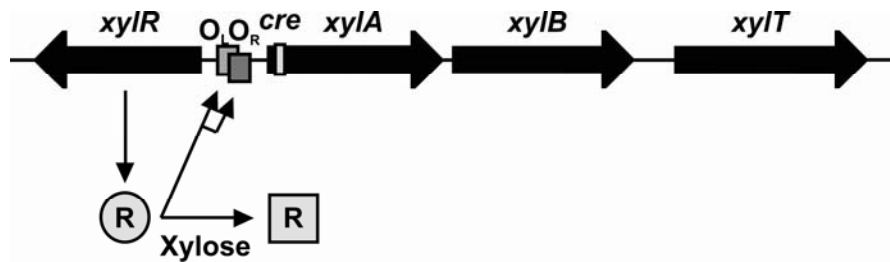


Abb. 3: Genetische Organisation des *xylABT*-Operons in *B. megaterium*. In Abwesenheit von Xylose bindet das Repressorprotein XylR (grauer Kreis) an die zwei überlappenden Operatoren O_L und O_R . In Anwesenheit von Xylose kommt es zu einer Konformationsänderung des Repressorproteins (graues Quadrat), so dass dieses nicht mehr an die Operatoren binden kann. *xylA*: Gen für die Xylose-Isomerase, *xylB*: Gen für die Xylulo-Kinase, *xylT*: Gen für die Xylose-Permease, *cre*: *catabolite responsive element*, Abbildung modifiziert nach Dahl *et al.*, 1995 und Schmiedel *et al.*, 1997.

Zusätzlich wird die Transkription des *xylABT*-Operons durch die Katabolitrepression reguliert, die durch das *cis*-agierende Element *cre* (*catabolite responsive element*), das im *xylA*-Gen lokalisiert ist (Abb. 3), und das *trans*-agierende Protein CcpA (*catabolite control protein*) vermittelt wird. Bei Anwesenheit von Glukose wird das Serin-46 des Phosphoenolpyruvat:Glukose-Phosphotransferase-System-Proteins HPr phosphoryliert. Durch die Interaktion des phosphorylierten HPr-Proteins mit CcpA wird die Bindung von CcpA an *cre* erhöht, was zu einer 14-fachen Repression der Expression führt (Rygus & Hillen, 1992, Dahl *et al.*, 1995, Deutscher *et al.*, 1995, Schmiedel *et al.*, 1997). Außerdem fungiert Glukose-6-Phosphat als Anti-Induktor, so dass die Inaktivierung von XylR durch Xylose behindert wird (Dahl *et al.*, 1995).

Rygus und Hillen (1991) konstruierten einen *shuttle*-Vektor für *B. megaterium* und *E. coli*, der das *xylR*-Gen und den *xylA*-Promotor mit dem Anfang des *xylA*-Gens enthält. Mittels dieses Vektors konnten die Glukose-Dehydrogenase von *B. megaterium*, die β -Galaktosidase von *E. coli*, die Mutarotase von *Acinetobacter calcoaceticus*, der humane Urokinase-Plasminogen-Aktivator und das Toxin A von *Clostridium difficile* erfolgreich intrazellulär produziert werden (Rygus & Hillen, 1991, Burger *et al.*, 2003). Der Vektor wurde in mehreren Schritten optimiert, indem das *cre*-Element entfernt sowie eine multiple Klonierungsstelle, die Gensequenz für das Signalpeptid der extrazellulären Lipase LipA aus

B. megaterium (Ruiz *et al.*, 2002) und verschiedene Affinitäts-Tags integriert wurden (Malten *et al.*, 2005a, Malten *et al.*, 2006).

1.6 Translokation von Proteinen durch die Cytoplasmamembran von grampositiven Bakterien

Im Gegensatz zu gramnegativen Bakterien müssen in grampositiven Bakterien sekretierte Proteine nur durch eine einzige Membran transportiert werden. Neben einigen sehr spezifischen Translokationswegen ist das Sec-Transportsystem das zentrale Proteintranslokationssystem in grampositiven Bakterien und zeigt eine große Ähnlichkeit zu dem Sec-Transportsystem von gramnegativen Zellen. Mit diesem Transportsystem werden Proteine ungefaltet durch die Cytoplasmamembran transportiert. Am besten charakterisiert ist das Sec-Translokationssystem von *B. subtilis* (Abb. 4), auf das sich der folgende Abschnitt bezieht.

Proteine, die sekretiert werden sollen, besitzen ein aminoterminalen Signalpeptid, welches vom Translokationssystem erkannt wird. Es gibt zwei Klassen von Signalpeptiden für das Sec-Translokationssystem: das allgemeine Signalpeptid (Typ I) und das Lipoprotein-Signalpeptid (Typ II). Ein Typ I Signalpeptid ist im Durchschnitt 14 – 25 Aminosäuren lang und besteht aus drei Regionen. Die Amino-Region besitzt viele positiv geladene Aminosäuren, die hydrophobe Region hat eine α -helikale Konformation und die carboxyterminale Region ist hydrophil und enthält die Schnittstelle, an der das Signalpeptid während oder kurz nach dem Transport abgespalten wird. Diese Schnittstelle hat die Aminosäuresequenz Alanin-X-Alanin. Das Lipoprotein-Signalpeptid besitzt den gleichen Aufbau, hat aber in der carboxyterminalen Region eine Lipoprotein-Box mit einer Leucin-Alanin-Glycin-Cystein Konsensussequenz (Van Wely *et al.*, 2001).

Um zu verhindern, dass zu sekretierende Proteine im Cytoplasma falten und aggregieren, halten cytoplasmatische Chaperone wie SRP (*signal recognition particle*)/FtsY und CsaA die Proteine in einem ungefalteten Zustand und übergeben sie der Translokationsmaschinerie in der Membran. Ein bedeutendes Protein des SRP/FtsY-Komplexes ist die GTPase Ffh (*fifty four homolog*). Dieses Protein bildet einen Komplex mit der scRNA (*small cytoplasmic RNA*) und dem

Protein HBSu. Dieser Komplex wird als SRP bezeichnet und bindet an das Signalpeptid des zu sekretierenden Proteins. Mit Hilfe des Proteins FtsY, ein Homolog des eukaryotischen SRP-Rezeptors, wird das zu sekretierende Protein zu der Translokationsmaschinerie in der Membran geleitet. Ein alternativer Weg könnte durch das Protein CsaA vermittelt werden (Honda *et al.*, 1993, Oguro *et al.*, 1995, Kurita *et al.*, 1996, Nakamura *et al.*, 1999, Van Wely *et al.*, 2001, Tjalsma *et al.*, 2004).

Die Translokationsmaschinerie besteht aus vier Proteinen: dem molekularen Motor SecA und den Membranproteinen SecE, SecG und SecY, die den SecYEG-Komplex bilden. SecA bindet an den SecYEG-Komplex und das zu sekretierende Protein wird von dem SRP-Komplex zu SecA transferiert. Durch das Binden von ATP an SecA findet eine Konformationsänderung statt, wodurch es zu einer Insertion des C-Terminus von SecA in die Pore des SecYEG-Komplexes kommt. Ein kurzes Stück des zu sekretierenden Proteins wird so durch die Pore transportiert. Aufgrund der nachfolgenden Hydrolyse des ATP kommt es zu einer Deinsertion des C-Terminus von SecA aus der Pore und zu einer Freisetzung des zu sekretierenden Proteins. Eine weitere Translokation erfolgt durch Wiederholung dieser Schritte (Van der Wolk *et al.*, 1997, Karamanou *et al.*, 1999, Van Wely *et al.*, 2001, Tjalsma *et al.*, 2004).

Neben SecA, SecY, SecE und SecG sind weitere Proteine an der Translokation von Proteinen durch die Cytoplasmamembran beteiligt. Für den SecDF/YrbF-Komplex wird vermutet, dass er an der Entfernung von abgespaltenen Signalpeptiden oder Transmembransegmenten sowie an der Freisetzung von sekretierten Proteinen aus der Pore des SecYEG-Komplexes beteiligt ist. Weitere Funktionen könnten die Regulation des SecA-Zyklus sowie die Verhinderung eines Zurückrutschens des zu sekretierenden Proteins sein. Die Proteine SpoIIJ und YqjG sind mit dem SecDF/YrbF-Komplex assoziiert und haben wahrscheinlich neben bisher unbekannten Funktionen die Aufgabe der Insertion von Membranproteinen in die Membran und/oder der Faltung von sekretierten Proteinen (Van Wely *et al.*, 2001, Tjalsma *et al.*, 2004).

Die Entfernung der Signalpeptide von den sekretierten Proteinen wird von Signalpeptidasen durchgeführt. *B. subtilis* besitzt fünf Typ I Signalpeptidasen (SipS, SipT, SipV, SipU und SipW), deren Gene auf dem Chromosom lokalisiert sind (Tjalsma *et al.*, 1997, Tjalsma *et al.*, 1998). Darüber hinaus wird eine

zusätzliche Signalpeptidase (SipP) auf einem Plasmid kodiert (Meijer *et al.*, 1995). Bei *B. megaterium* wurde bisher eine Typ I Signalpeptidase (SipM) identifiziert (Nahrstedt *et al.*, 2004). An dem Abbau der abgespaltenen Signalpeptide sind in *B. subtilis* vermutlich die Proteine SppA und TepA beteiligt. Für das Entfernen von Lipoprotein-Signalpeptiden besitzt *B. subtilis* eine Typ II Signalpeptidase (LspA). Die Modifikation von Lipoproteinen wird von dem Protein Lgt durchgeführt (Van Wely *et al.*, 2001, Tjalsma *et al.*, 2004).

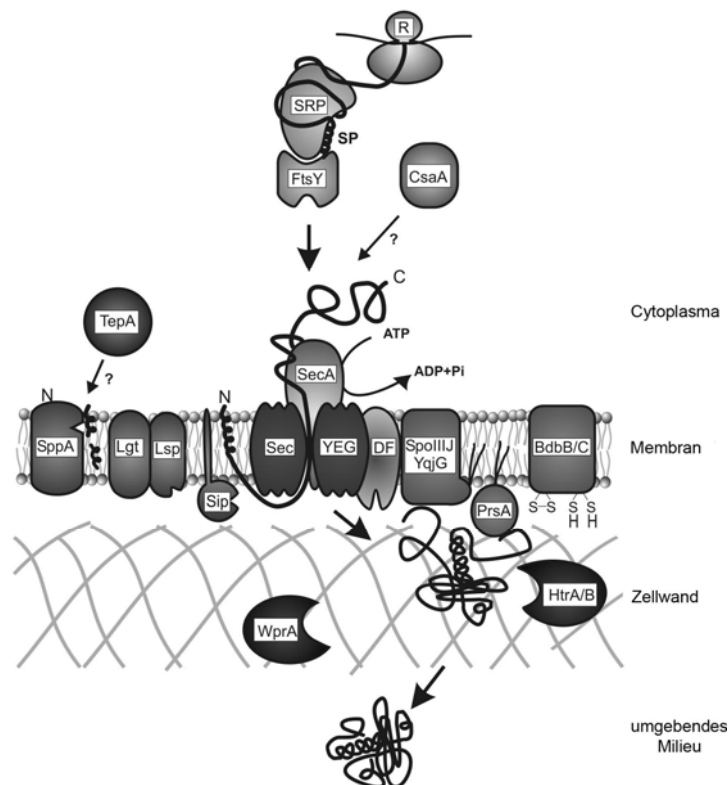


Abb. 4: Das Sec-Translokationssystem von *B. subtilis*. Das zu sekretierende Protein wird mit einem Signalpeptid (SP) von einem Ribosom (R) synthetisiert und in einem ungefalteten Zustand von dem SRP/FtsY-Komplex oder CsaA zur Translokationsmaschinerie geleitet. Die Translokationsmaschinerie besteht aus den Proteinen SecA, SecY, SecE, SecG und SecDF/YrbF. SpoIIJ und YqjG haben wahrscheinlich die Aufgabe der Insertion von Membranproteinen in die Membran und/oder der Faltung von sekretierten Proteinen. Das Signalpeptid wird während oder kurz nach der Translokation von einer Signalpeptidase (Sip und Lsp) abgespalten. Die Modifikation von Lipoproteinen wird von dem Protein Lgt durchgeführt. SppA und TepA sind wahrscheinlich an der Degradation des abgespaltenen Signalpeptids beteiligt. Die Faltung des sekretierten Proteins wird durch die Proteine PrsA und BdbBC durchgeführt. HtrA, HtrB und WprA führen die Qualitätskontrolle der sekretierten Proteine durch. Nach dem Durchqueren der Zellwand werden die Proteine in das umgebende Milieu freigesetzt. Abbildung aus Tjalsma *et al.*, 2004 (modifiziert).

Da Proteine im ungefalteten Zustand durch die Cytoplasmamembran transportiert werden, müssen sie nach dem Transport gefaltet werden. Ein wichtiges Protein für die Faltung von extrazellulären Proteinen ist das Lipoprotein PrsA. Für die Formation von Disulfidbrücken stehen *B. subtilis* die vier extrazellulären Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen BdbA, BdbB, BdbC und BdbD zur Verfügung. Ist ein Protein nicht korrekt gefaltet, können die Proteine HtrA, HtrB und WprA bei dessen Faltung helfen oder es abbauen. Nach dem Durchqueren der Zellwand werden die Proteine in das umgebende Milieu freigesetzt (Tjalsma *et al.*, 2004).

1.7 Produktion und Sekretion von rekombinanten Proteinen in *B. megaterium*

Durch seine sehr gute Proteinsekretionskapazität konnten in der Vergangenheit erfolgreich mehrere rekombinante, extrazelluläre Proteine in *B. megaterium* produziert und sekretiert werden. Ein Beispiel ist die Endo- β -1,3-1,4-Glukanase von *Bacillus circulans*. Mittels *B. megaterium* konnte zwar weniger Protein produziert werden als mittels *B. subtilis*, *B. megaterium* zeigte aber eine höhere Plasmidstabilität als *B. subtilis* (Kim, 2003).

Mit dem in Abschnitt 1.5 beschriebenen Vektorsystem konnte die Dextranucrase DsrS von *Leuconostoc mesenteroides* in *B. megaterium* hergestellt und ins umgebende Medium exportiert werden. Die DsrS-Ausbeuten konnten durch die Verwendung des proteasedefizienten Stamms MS941 sowie eines semidefinierten Mediums gesteigert werden. Hochzelldichtekultivierungen führten aber zur intrazellulären DsrS-Aggregation (Malten *et al.*, 2005a). Die Koexpression der Typ I Signalpeptidase SipM aus *B. megaterium* erhöhte ebenfalls die rekombinante DsrS-Produktion und Sekretion (Malten *et al.*, 2005b).

Die Levansucrase aus *Lactobacillus reuteri* wurde mit verschiedenen Affinitäts-Tags und zwei verschiedenen Signalpeptiden in *B. megaterium* sekretorisch produziert. Die Verwendung des Signalpeptids der extrazellulären Lipase LipA führte zu höheren Ausbeuten an sekretiertem Protein als die Verwendung des Signalpeptids der Penicillin-Amidase Pac. Die Ausbeute konnte ebenfalls durch

die Koexpression der Signalpeptidase SipM gesteigert werden (Malten *et al.*, 2006, Biedendieck *et al.*, 2007).

Die Hydrolase aus *Thermobifida fusca* und die Penicillin G-Amidase aus *B. megaterium* ATCC14945 konnten ebenfalls erfolgreich produziert und sekretiert werden, wobei die *codon usage* des Hydrolase-Gens vorher optimiert werden musste (Yang *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2007).

1.8 Zielsetzung

Auf Basis der in Abschnitt 1.5 beschriebenen *B. megaterium*-Expressionsvektoren sollte ein Basisvektor für die Klonierung und Expression von Antikörperfragmentgenen konstruiert werden. Mittels dieses Vektors sollte der Modellantikörper D1.3 im scFv-Format in *B. megaterium* produziert und sekretiert werden. Hierbei sollten die Produktionsparameter, wie Temperatur, Dauer und Medium optimiert werden. Weiterhin sollten auf Grundlage der optimierten Produktionsparameter andere Antikörperfragmente extrazellulär in *B. megaterium* hergestellt und aufgereinigt werden. Die Produktion von Antikörperfragmenten in *B. megaterium* sollte mit der in dem etablierten Produktionswirt *E. coli* verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tab. 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Halbmikro-Küvetten 0,5 – 2 mL	Biostep (Jahnsdorf)
Mikrotiterplatten	Maxisorp, Nunc (Wiesbaden)
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße 1,5/2 mL	Sarstedt (Nümbrecht)
Mikro-Schraubröhre 2 mL	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße 15/50 mL	Corning Incorporated (Corning, USA)
Petrischalen	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Spritzenfilter 0,2 µm	Sartorius (Göttingen)
Impfösen	Brand (Wertheim)
Spatel	VWR International (Darmstadt)
Spritzen	B. Braun (Melsungen)
Dialysemembran	Visking, Carl Roth (Karlsruhe)
Dialysekammer	Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette, Pierce (Rockford, USA)
PVDF-Membran	Carl Roth (Karlsruhe)
Filterpapier	Bio-Rad (München)

2.1.2 Geräte

Tab. 2: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Inkubator	Modell BE 400	Memmert (Schwabach)
Schüttelinkubator	Certomat BS-1	B. Braun (Melsungen)
	Inkubationsschüttelschrank BS-4	B. Braun (Melsungen)
Sterilbank	MSC-Advantage	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Waagen	A120S	Sartorius (Göttingen)
	LC6200D	Sartorius (Göttingen)
	KERN EMB 220-1	Kern & Sohn (Balingen-Frommern)
Wasserbad	Typ 1013	GFL (Burgwedel)
Reinstwasser-Anlage	Arium 611	Sartorius (Göttingen)
pH-Meter	pH-Meter CG 810	Schott (Mainz)
Wippe	Typ 3013	GFL (Burgwedel)
Magnetrührer	KMO 2 electronic	IKA (Staufen)
Überkopfschüttler	Rotator	G. Kisker (Steinfurt)
Vortex-Mixer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
	Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Spektrophotometer	ND-1000	NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)
	Libra S11	Biochrom (Cambridge, England)

Pipetten	Research	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifugen	Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
	Centrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
	Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
	Sorvall RC-5	Kendro (Berlin)
Blot-Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry	Bio-Rad (München)
	Transfer Cell	
Gelelektrophoresekammer	Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad (München)
	PerfectBlue Mini S, M und ExM	Peqlab (Erlangen)
Netzgeräte	PowerPac HC Power Supply	Bio-Rad (München)
	Power Supply ESP 301	Amersham Biosciences (Piscataway, USA)
Thermocycler	DNA Engine	Bio-Rad (München)
DNA-Sequenzieranlage	ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Geldokumentationsanlage	Gel Jet Imager	Intas (Göttingen)
ELISA-Washer	Columbus plus	Tecan (Crailsheim)
ELISA-Reader	SunRise	Tecan (Crailsheim)
Lichtmikroskop	Axioskop	Carl Zeiss (Jena)

2.2 Chemikalien, Enzyme, Antikörper und Kit-Systeme

2.2.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien und Biochemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Hamburg), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Fermentas (St. Leon-Rot), Becton Dickinson (Heidelberg), Fulka/Riedel-de-Haën (Seelze), Serva (Heidelberg) und Roche (Mannheim) bezogen.

2.2.2 Enzyme

Tab. 3: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Hühnereiweißlysozym	Carl Roth (Karlsruhe)
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Combizyme DNA-Polymerase	Invitak (Berlin)
Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
RedTaq DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich (Hamburg)
GoTaq Flexi DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt am Main), Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
T4 DNA-Ligase	Promega (Mannheim)

2.2.3 Antikörper

Tab. 4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Maus anti-His ₅	Qiagen (Hilden)
Ziege anti-Maus IgG AP (Fab spezifisch)	Sigma-Aldrich (Hamburg), Dianova (Hamburg)
Ziege anti-Maus IgG AP (Fc spezifisch)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Herceptin	Roche (Prenzlberg)
TM44-C7.3 scFv	T. Meyer, AG Dübel
Ziege anti-Maus IgG HRP (Fab spezifisch)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Ziege anti-Maus IgG HRP (Fc spezifisch)	Sigma-Aldrich (Hamburg)

2.2.4 Kit-Systeme

Tab. 5: Verwendete Kit-Systeme

Kit-System	Hersteller
GenElute HP Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich (Hamburg)
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences (Piscataway, USA)
DNA Purification Kit	Biozym (Oldendorf)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

2.2.5 Sonstiges

Tab. 6: Sonstige verwendete Materialien

Bezeichnung	Hersteller
6x Loading Dye Solution	Fermentas (St. Leon-Rot)
6x Orange Loading Dye Solution	Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas (St. Leon-Rot)
10x T4 DNA-Ligase Puffer mit ATP	New England Biolabs (Frankfurt)
dNTPs	Fermentas (St. Leon-Rot)
5x BigDye Terminator v1.1/v3.1 Sequencing Buffer	Applied Biosystems (Forster City, USA)
BigDye Terminator v1.1	Applied Biosystems (Forster City, USA)
HiDi	Applied Biosystems (Forster City, USA)
Protein Assay	Bio-Rad (München)
Precision Plus Protein Unstained Standard	Bio-Rad (München)
Precision Plus Protein Prestained Standard Dual Color	Bio-Rad (München)
BSA	Serva (Heidelberg)
CRP	BiosPacific (Emeryville, USA)
Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Biosciences (Piscataway, USA)

2.3 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurde für alle Puffer und Lösungen Wasser aus der Reinstwasser-Anlage verwendet.

2.3.1 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock nach der Rubidium-Chlorid-Methode

TBF 1	CaCl ₂	10	mM
	C ₂ H ₃ KO ₂	30	mM
	RbCl	100	mM
	MnCl ₂	50	mM
	Glycerin	15	% (v/v)
	pH 5,8 titriert mit Essigsäure		
TBF 2	MOPS	10	mM
	RbCl	10	mM
	CaCl ₂	75	mM
	Glycerin	15	% (v/v)
	pH 8,0 titriert mit KOH		

2.3.2 Transformation von *B. megaterium*

SMMP	2x AB3	50	% (v/v)
	2x SMM	50	% (v/v)
2x AB3	Antibiotic Medium No. 3 (Difco, Augsburg)	3,5	% (w/v)
2x SMM	Maleinsäure	40	mM
	NaOH	80	mM
	MgCl ₂	40	mM
	Saccharose	1	M
	pH 6,5		
LysozymbLösung	Hühnereiweißlysozym in 500 µL SMMP lösen	1 Spatelspitze	
Natriumacetatlösung	Natriumacetat pH 5,2	3	M
PEG-P	PEG-6000 in 1x SMM-Lösung lösen	40	% (w/v)
CR5-Topagar	Lösung A	50	% (v/v)
	Lösung B	28,5	% (v/v)
	CR5-Salze	11,5	% (v/v)
	Prolinlösung	5	% (v/v)
	Glukoselösung	5	% (v/v)

Lösung A	Saccharose	602	mM
	MOPS	62	mM
	NaOH	30	mM
	pH 7,3 titriert mit NaOH		
Lösung B	Agar-Agar	1,4	% (w/v)
	Casaminosäuren	0,07	% (w/v)
	Hefe-Extrakt	3,5	% (w/v)
CR5-Salze	K ₂ SO ₄	11	mM
	MgCl ₂	394	mM
	KH ₂ PO ₄	3	mM
	CaCl ₂	160	mM
Prolinlösung	Prolin	1	M
Glukoselösung	Glukose	1,1	M

2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA

S1	Tris-HCl (pH 8,0)	50	mM
	EDTA	10	mM
	RNase	100	mg/L
S2	NaOH	200	mM
	SDS	0,2	% (w/v)
S3	Essigsäure		
	pH 4,8 titriert mit KOH		

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE	Tris	2	M
	Essigsäure	1	M
	EDTA (pH 8,0)	50	mM
Agarosegel	Agarose	1 – 2	% (w/v)
	in 1x TAE lösen		

2.3.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sammelgelpuffer	Tris-HCl (pH 6,8)	1	M
Trenngelpuffer	Tris-HCl (pH 8,8)	1,5	M
Aminoperoxodisulfatlösung	Aminoperoxodisulfat	10	% (w/v)

Acrylamidmix	Acrylamid	30	% (w/v)
	Bisacrylamid	0,8	% (w/v)
SDS-Lösung	SDS	10	% (w/v)
Sammelgel	Wasser	1	mL
	Acrylamidmix	260	µL
	Sammelgelpuffer	200	µL
	SDS-Lösung	15	µL
	Aminoperoxodisulfatlösung	15	µL
	TEMED	2	µL
10%iges Trenngel	Wasser	1,6	mL
	Acrylamidmix	1,3	mL
	Trenngelpuffer	1	mL
	SDS-Lösung	40	µL
	Aminoperoxodisulfatlösung	40	µL
	TEMED	2	µL
12%iges Trenngel	Wasser	1,3	mL
	Acrylamidmix	1,6	mL
	Trenngelpuffer	1	mL
	SDS-Lösung	40	µL
	Aminoperoxodisulfatlösung	40	µL
	TEMED	2	µL
Laufpuffer	Tris-HCl (pH 8,3)	25	mM
	Glycin	193	mM
	SDS	0,1	% (w/v)
5x SDS-Probenpuffer	SDS	3,6	% (w/v)
	Glycerin	50	% (v/v)
	β-Mercaptoethanol	15	% (v/v)
	Bromphenolblau	0,02	% (w/v)

2.3.6 Coomassiefärbung von Proteinen

Färbelösung	Isopropanol	25	% (v/v)
	Essigsäure	10	% (v/v)
	Coomassie Blau G-250	0,5	% (w/v)
Entfärbelösung	Isopropanol	25	% (v/v)
	Essigsäure	10	% (v/v)

2.3.7 Immunoblot

Laufpuffer	Tris-HCl (pH 8,3)	25	mM
	Glycin	193	mM
PBS	Na ₂ HPO ₄	7,5	mM
	NaH ₂ PO ₄	2,2	mM
	NaCl	145	mM

Material und Methoden

3% MPBS	Milchpulver in PBS gelöst	3	% (w/v)
0,1% PBST	Tween 20 in PBS	0,1	% (v/v)
Substratpuffer	Tris-HCl (pH 9,5) MgCl ₂	100 500	mM μM
Substratlösung	BCIP-Lösung NBT-Lösung in Substratpuffer	1 1	% (v/v) % (v/v)
BCIP-Lösung	BCIP in Dimethylformamid	1,5	% (w/v)
NBT-Lösung	NBT in 70%igem (v/v) Dimethylformamid	3	% (w/v)

2.3.8 Antigen-ELISA

0,05% PBST	Tween 20 in PBS	0,05	% (v/v)
2% MPBST	Milchpulver Tween 20 in PBS gelöst	2 0,1	% (w/v) % (v/v)
Substratlösung	TMB A TMB B	95,2 4,8	% (v/v) % (v/v)
TMB A	Kaliumcitrat Zitronensäure pH 4,1	30 52	mM mM
TMB B	Tetramethylbenzidin Aceton Ethanol 30%iges H ₂ O ₂	10 9,9 89,2 0,9	mM % (v/v) % (v/v) % (v/v)

2.3.9 Periplasmapräparation

Schockpuffer	Saccharose	584	mM
	Tris	50	mM
	EDTA	1	mM
	pH 8,0 titriert mit HCl		

2.3.10 Aufreinigung von Antikörperfragmenten mittels *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC)

Bindepuffer	Imidazol	10	mM
	Na ₂ HPO ₄	20	mM
	NaCl	500	mM
	pH 7,4		
Waschpuffer 20 mM Imidazol	Imidazol	20	mM
	Na ₂ HPO ₄	20	mM
	NaCl	500	mM
	pH 7,4		
Waschpuffer 50 mM Imidazol	Imidazol	50	mM
	Na ₂ HPO ₄	20	mM
	NaCl	500	mM
	pH 7,4		
Elutionspuffer 1	NaH ₂ PO ₄	50	mM
	NaCl	300	mM
	Imidazol	250	mM
	pH 8,0		
Elutionspuffer 2	EDTA	100	mM
	in PBS		

2.4 Nährmedien und Zusätze

2.4.1 Nährmedien

Die Zusammensetzungen der Nährmedien wurden bezogen aus Promega, 1996, Roskams & Rodgers, 2002 und Barg *et al.*, 2005. Für alle Nährmedien wurde Wasser aus der Reinstwasser-Anlage verwendet.

LB-Medium	Trypton	1	% (w/v)
	Hefe-Extrakt	0,5	% (w/v)
	NaCl	171	mM
M9-Medium	Na ₂ HPO ₄	48	mM
	KH ₂ PO ₄	22	mM
	NaCl	8,6	mM
	NH ₄ Cl	19	mM
	Glukose	22	mM
	MgSO ₄	2	mM
	CaCl ₂	100	µM

Die Glukose, das MgSO₄ und das CaCl₂ wurden nach dem Autoklavieren hinzugeben.

A5-Medium	(NH ₄) ₂ SO ₄	15	mM
	MgSO ₄	2,5	mM
	Hefe-Extrakt	0,05	% (w/v)
	MnCl ₂	247	µM
	CaCl ₂	360	µM
	FeSO ₄	9	µM
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	2	µM
	CoCl ₂	11	µM
	Glukose	167	mM
	KH ₂ PO ₄	26	mM
	Na ₂ HPO ₄	41	mM

Die Glukose, das KH₂PO₄ und das Na₂HPO₄ wurden nach dem Autoklavieren hinzugeben.

2xTY-Medium	Trypton	1,6	% (w/v)
	Hefe-Extrakt	1	% (w/v)
	NaCl	86	mM

TB-Medium	Trypton	1,2	% (w/v)
	Hefe-Extrakt	2,4	% (w/v)
	Glycerin	0,4	% (v/v)
	KH ₂ PO ₄	17	mM
	K ₂ HPO ₄	72	mM

Das KH₂PO₄ und das K₂HPO₄ wurden nach dem Autoklavieren hinzugeben.

SOC-Medium	Trypton	2	% (w/v)
	Hefe-Extrakt	0,5	% (w/v)
	NaCl	10	mM
	KCl	2,5	mM
	MgCl ₂	10	mM
	MgSO ₄	10	mM
	Glukose	20	mM

Die Glukose, das MgCl₂ und das MgSO₄ wurden nach dem Autoklavieren hinzugeben.

2.4.2 Zusätze

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Zusätze in Wasser aus der Reinstwasser-Anlage gelöst.

Tab. 7: Nährmedienzusätze

Nährmedienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/mL	100 µg/mL
Chloramphenicol	34 mg/mL in Ethanol	34 µg/mL
Tetracyclin	10 mg/mL in Ethanol	10 µg/mL
Kanamycin	10 mg/mL	50 µg/mL
Glukose	2 M	100 mM
L-Arabinose	20 % (w/v)	0,2 % (w/v)
D(+)-Xylose	25 % (w/v)	0,5 % (w/v)
IPTG	1 M	50 µM
X-gal	40 mg/mL in Dimethylformamid	1,6 mg pro LB-Agar-Platte
Agar-Agar	/	1,5 % (w/v)

2.5 Bakterienstämme und Plasmide

2.5.1 Bakterienstämme

Tab. 8: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ <i>endA1 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI^f</i> Δ M15 Tn 10 (Tet ^r)]	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>E. coli</i> DH10B	F' <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74$ <i>deoR recA1</i> <i>endA1 araD139</i> $\Delta(ara, leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK rpsL nupG</i>	Gibco Life Technologies (Eggenstein)
<i>E. coli</i> DH5 α	F' $\Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻, m_k⁺</i>) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ^{-} <i>thi1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>B. megaterium</i> MS941	Mutante von DSM319, $\Delta nprM$	Wittchen & Meinhard, 1995

2.5.2 Plasmide

Tab. 9: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pHIS1525	Vektor für Klonierung in <i>E. coli</i> (Amp ^r) und Produktion und Sekretion von Proteinen durch Induktion mit Xylose (P _{xyIA}) in <i>B. megaterium</i> (Tet ^r) mit den Gensequenzen für das Signalpeptid der <i>B. megaterium</i> -Lipase LipA (SP _{lipA}) und einen C-terminalen His ₆ -Tag	Malten <i>et al.</i> , 2006
pEJBmopSplipA	Vektor für Klonierung in <i>E. coli</i> (Amp ^r) und Produktion und Sekretion von Proteinen durch Induktion mit Xylose (P _{xyIA}) in <i>B. megaterium</i> (Tet ^r) mit einer <i>codon usage</i> optimierten Gensequenz für das Signalpeptid der <i>B. megaterium</i> -Lipase LipA (SP _{lipA}) und Sequenzen für einen C-terminalen His ₆ -Tag und den Terminator T4	diese Arbeit
pEJBmD1.3scFv	pEJBmopSplipA-Derivat mit dem D1.3 scFv-Gen	diese Arbeit
pEJBmLA13-IIE3scFv	pEJBmopSplipA-Derivat mit dem LA13-IIE3 scFv-Gen	diese Arbeit
pEJBmD1.3scFab Δ C	pEJBmopSplipA-Derivat mit dem D1.3 scFab Δ C-Gen	diese Arbeit

pMMEc4	<i>E. coli</i> -Vektor mit <i>xylR</i> unter der Kontrolle eines mit L-Arabinose induzierbaren Promotors, Cln^r	Jordan <i>et al.</i> , 2007
pCR2.1-TOPO	<i>E. coli</i> -Vektor des <i>TOPO TA Cloning Kit</i> , linearisiert mit T-Überhängen und kovalent gebundener Topoisomerase I, <i>lacZα</i> für blau/weiß-Selektion, Kan^r , Amp^r	Invitrogen, Karlsruhe
pHAL1-D1.3scFv	<i>E. coli</i> -Phagen-Display-Vektor mit dem D1.3 scFv-Gen	Hust <i>et al.</i> , 2007
pIT2-CRP-IIE3	<i>E. coli</i> -Phagen-Display-Vektor der Antikörpergenbibliothek Tomlinson mit dem LA13-IIE3 scFv-Gen	L. Al-Halabi, AG Dübel
pHAL1-D1.3scFab Δ C	<i>E. coli</i> -Phagen-Display-Vektor mit dem D1.3 scFab Δ C-Gen	Hust <i>et al.</i> , 2007
pOPE101-D1.3scFv	<i>E. coli</i> -Vektor für D1.3 scFv-Produktion und -Sekretion durch Induktion mit IPTG mit einer Gensequenz für das Signalpeptid der bakteriellen Pektatlyase (SP_{pelB}) und Sequenzen für einen C-terminalen c-Myc- und His ₆ -Tag, Amp^r	Hust <i>et al.</i> , 2007
pOPE101-LA13-IIE3scFv	<i>E. coli</i> -Vektor für LA13-IIE3 scFv-Produktion und -Sekretion durch Induktion mit IPTG mit einer Gensequenz für das Signalpeptid der bakteriellen Pektatlyase (SP_{pelB}) und Sequenzen für einen C-terminalen c-Myc- und His ₆ -Tag, Amp^r	L. Al-Halabi, AG Dübel
pOPE101-D1.3scFab Δ C	<i>E. coli</i> -Vektor für D1.3 scFab Δ C-Produktion und -Sekretion durch Induktion mit IPTG mit einer Gensequenz für das Signalpeptid der bakteriellen Pektatlyase (SP_{pelB}) und Sequenzen für einen C-terminalen c-Myc- und His ₆ -Tag, Amp^r	Hust <i>et al.</i> , 2007

2.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers.net (Ulm) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Tab. 10: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' – 3')	Funktion
EJoligoHisTermf.	cgg ccg ctc atc acc atc acc atc act aaa aag ccc tca atg aag agg gct ttt ttt aa	Enthält Sequenzen für eine <i>NotI</i> -Restriktionsschnittstelle, einen His ₆ -Tag, ein Stopp-Codon und den Terminator T4, zur Hybridisierung mit dem Oligonukleotid EJoligoHisTermr.
EJoligoHisTermr.	ccg gtt aaa aaa agc cct ctt cat tga ggg ctt ttt agt gat ggt gat ggt gat gag ccg ccg cat g	Enthält Sequenzen für eine <i>NotI</i> -Restriktionsschnittstelle, einen His ₆ -Tag, ein Stopp-Codon und den Terminator T4, zur Hybridisierung mit dem Oligonukleotid EJoligoHisTermf.
EJpEJ2oligoseqf.	ggg gga aat gta caa tga a	Sequenzierung
EJpEJ2oligoseqr.	tat gga aaa acg cca gca a	Sequenzierung
EJopSplipAf.	cgc agt gta caa tga aaa aag tat taa tgg ctt tca tta ttt gtt tat cat taa ttt tat cag tat tag c	Vervielfältigung der <i>codon usage</i> optimierten Gensequenz von SP _{lipA}
EJopSplipAr.	cgc aga gat ctt caa tgc ggc gct agc acc tga tgg tgg agc agc taa tac tga taa aat taa tga taa	Vervielfältigung der <i>codon usage</i> optimierten Gensequenz von SP _{lipA}
EJopSplipAseqf.	ccg aac taa gtt ggt gtt t	Sequenzierung
EJD1.3Nhelf.	cgc agg cta gcg ccg aag tta aac tgc agg agt cag gac ct	Vervielfältigung des D1.3 scFv-Gens
EJD1.3r.	cgc agg ccg ccg cct tca gct cga	Vervielfältigung des D1.3 scFv-Gens
EJXylRseqf.	ctc tcg gtt atg agt tag t	Sequenzierung
EJPromotorseqf.	gca tat ggg tta caa aac c	Sequenzierung
EJD1.3seqf.	acc acg gtc acc gtc tcg	Sequenzierung des D1.3 scFv-Gens
EJD1.3seqr.	aca gac gca gaa agg gag	Sequenzierung des D1.3 scFv-Gens
EJCRPIIE3f.	cgc agg cta gcg ccg agg tgc agc tgt tgg agt ctg	Vervielfältigung des LA13-IIE3 scFv-Gens
EJCRPIIE3r.	cgc agg ccg ccg ccc gtt tga ttt cca cct	Vervielfältigung des LA13-IIE3 scFv-Gens
EJIIIE3scFvseqf.	gtg ggt ctc agc tat tag t	Sequenzierung des LA13-IIE3 scFv-Gens
EJIIIE3scFvseqr.	ctg gtt tct gct gat acc a	Sequenzierung des LA13-IIE3 scFv-Gens

EJD1.3scFabf.	cgc agg cta gcg ccg aca tcg agc tca ccc agt ctc cag	Vervielfältigung des D1.3 scFab Δ C-Gens
EJD1.3scFabr.	cgc agg cgg ccg cat cgc gcg gta	Vervielfältigung des D1.3 scFab Δ C-Gens
M13f.	ggt ttc cca gtc acg ac	Sequenzierung
M13r.	cag gaa aca gct atg ac	Sequenzierung
EJD1.3scFabdC1seqf.	gca tgg tat cag cag aaa c	Sequenzierung des D1.3 scFab Δ C-Gens
EJD1.3scFabdC2seqf.	agt tgg act gat cag gac a	Sequenzierung des D1.3 scFab Δ C-Gens
EJD1.3scFabdC3seqf.	atg gtg taa act ggg ttc g	Sequenzierung des D1.3 scFab Δ C-Gens
EJD1.3scFabdC4seqf.	gtg acc tgg aac tct gga t	Sequenzierung des D1.3 scFab Δ C-Gens
HT-seq-D1.3scFv- VLkappa-r.	gta taa tag acc agg agc tga gga gat	Sequenzierung des D1.3 scFab Δ C-Gens

2.7 Computerprogramme

Tab. 11: Verwendete Computerprogramme

Computerprogramm	Hersteller
Vector NTI	InforMax (Frederick, USA)
Gene Construction Kit	Textco BioSoftware (West Lebanon, USA)
FinchTV	Geospiza (Seattle, USA)
ImageJ	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
JCat	TU Braunschweig (Braunschweig)
ClustalW2	EMBL (Cambridge, England)

2.8 Mikrobiologische Techniken

2.8.1 Sterilisation

Alle Medien, Lösungen und Gefäße wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert. Temperaturempfindliche Substanzen wurden mittels eines Filters mit der Porengröße 0,2 µm steriltfiltriert.

2.8.2 Bakterienkultivierung

Für die Kultivierung von *B. megaterium* und *E. coli* wurden nur sterile Medien, Lösungen und Gefäße verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten ebenfalls unter sterilen Bedingungen.

2.8.3 Plattenkulturen von Bakterien

Bakterien aus einer Flüssigkultur wurden mit einem Drygalski-Spatel auf Agar-Platten mit den entsprechenden Zusätzen ausgestrichen. Bakterienkolonien oder Bakterien aus Glycerinkulturen wurden mittels steriler Pipettenspitzen auf Agar-Platten mit den entsprechenden Zusätzen übertragen und mit Impfösen ausgestrichen. Die Kultivierung der Plattenkulturen erfolgte über Nacht bei 37 °C.

2.8.4 Flüssigkulturen von Bakterien

Vorkulturen wurden mit einzelnen Kolonien von Agar-Platten mittels sterilen Pipettenspitzen angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden 1:30 – 1:100 mit der Vorkultur angeimpft und bei der entsprechenden Temperatur mit 250 rpm (Certomat BS-1, Inkubationsschüttelschrank BS-4) schüttelnd in Kolben ohne Schikanen inkubiert.

2.8.5 Bestimmung von Zelldichten

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm mittels eines Spektrophotometer bestimmt. Es wurden unverdünnte oder 1:10 verdünnte Bakterienkulturen vermessen. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht ca. einer Zellzahl von 10⁹ Zellen/mL.

2.8.6 Lagerung von Bakterien

Zur Lagerung der Bakterien wurden Glycerinkulturen verwendet. Hierfür wurden die Bakterienkulturen 1:1 mit 80%igem (v/v) Glycerin gemischt und bei -80 °C eingefroren.

2.8.7 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock nach der Rubidium-Chlorid-Methode

Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

100 mL LB-Medium bzw. LB-Medium mit Chloramphenicol wurden 1:100 mit einer *E. coli* bzw. *E. coli*::pMMEc4 Vorkultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,7 schüttelnd inkubiert. Die Bakterienkultur wurde anschließend 5 min bei 3250 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 40 mL kalter, steriler TBF 1-Lösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde 90 min auf Eis inkubiert und 5 min bei 3250 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 4 mL kalter, steriler TBF 2-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 120 µL-Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

Transformation

50 µL kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit 1 µL Plasmidlösung bzw. dem kompletten Ligationsansatz vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 1 min auf 42 °C erwärmt und 1 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 1 mL SOC-Medium wurde die Zellsuspension 1 h bei 37 °C und 600 rpm (Thermomixer comfort bzw. compact, Eppendorf) inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Zusätzen ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.8.8 Transformation von *B. megaterium*

Protoplastenherstellung

50 mL LB-Medium wurden 1:50 mit einer Vorkultur von *B. megaterium* angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1 schüttelnd inkubiert. Die Bakterienkultur wurde anschließend 15 min bei 3250 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 5 mL frisch hergestellter SMMP-Lösung resuspendiert und mit 50 µL Lysozymlösung zum Abbau der Zellwand vermischt. Die Zellsuspension wurde 15 min bei 37 °C inkubiert und die Protoplastenbildung mikroskopisch kontrolliert. Die Protoplastensuspension wurde 10 min bei 1268 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen der Protoplasten wurde das Zellsediment vorsichtig in 5 mL SMMP-Lösung resuspendiert und erneut 10 min bei 1268 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 5 mL SMMP-Lösung vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 750 µL 87%igem Glycerin vorsichtig vermischt und in 500 µL-Aliquots aufgeteilt. Die Lagerung der Protoplasten erfolgte bei -80 °C.

Präzipitation von Plasmid-DNA

5 µg Plasmid-DNA wurde zum Präzipitieren mit 1/10 Volumen Natriumacetatlösung und 2,5 Volumen Ethanol vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung 30 min bei 16000 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die präzipitierte Plasmid-DNA wurde zweimal mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µL SMMP-Lösung resuspendiert.

Transformation

500 µL Protoplastensuspension wurden anschließend mit der Plasmid-DNA-Lösung vorsichtig vermischt und in 1,5 mL PEG-P-Lösung überführt. Nach 2 min Inkubation wurden 5 mL SMMP-Lösung zugegeben und die Protoplastensuspension 10 min bei 1268 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 500 µL SMMP-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 30 °C 45 min ohne schütteln und 45 min mit schütteln bei 300 rpm (Thermomixer comfort bzw. compact, Eppendorf) inkubiert. Nach der

Inkubation wurde die Zellsuspension in 2,5 mL CR5-Topagar überführt und auf der Oberfläche einer LB-Tet-Agar-Platte verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C über Nacht.

2.8.9 Produktion von Antikörperfragmenten in *B. megaterium*

100 mL TB-Medium mit Tetracyclin wurden 1:100 mit einer Vorkultur von *B. megaterium*, der den entsprechenden Expressionsvektor enthielt, angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,4 bei 250 rpm (Certomat BS-1, Inkubationsschüttelschrank BS-4) schüttelnd inkubiert. Die Produktion wurde mit 0,5 % (w/v) Xylose induziert und die Kultur bei 41 °C für 24 h weiter bei 250 rpm inkubiert.

2.8.10 Produktion von Antikörperfragmenten in *E. coli*

300 mL 2xTY-Medium mit Ampicillin und Glukose wurden 1:30 mit einer Vorkultur von *E. coli* XL1-Blue MRF', der den entsprechenden Expressionsvektor enthielt, angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 250 rpm (Certomat BS-1, Inkubationsschüttelschrank BS-4) schüttelnd inkubiert. Die Produktion wurde mit 50 µM IPTG induziert und die Kultur bei 30 °C für 3 h weiter bei 250 rpm inkubiert.

2.9 Molekularbiologische Techniken

2.9.1 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmidpräparationen wurden entweder mit dem *GenElute HP Plasmid Midiprep Kit* oder mit klassischer alkalischer Lyse durchgeführt. Dazu wurden 1,5 mL Bakterienkultur für 1 min bei 16100 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 300 µL S1-Lösung resuspendiert. Zur alkalischen Lyse

wurden 300 µL S2-Lösung zugegeben und die Bakteriensuspension 5 min inkubiert. Anschließend wurden 300 µL S3-Lösung zur Protein- und RNA-Präzipitation zugegeben, 5 min inkubiert und 15 min bei 16100 xg zentrifugiert. 800 µL des plasmidhaltigen Überstandes wurden zur Präzipitation der DNA mit 560 µL Isopropanol vermischt und 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 16000 xg und 4 °C wurde der Überstand verworfen und die präzipitierte DNA mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde getrocknet und in 50 µL dH₂O resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.9.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm und 260 nm photometrisch bestimmt. Bei reiner DNA beträgt der Quotient A_{260}/A_{280} ca. 1,9. Eine A_{260} von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/mL.

2.9.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA wurde in 1 – 2%igen (w/v) Agarosegelen in einem elektrischen Feld von 100 – 130 V proportional zum negativen Logarithmus ihrer Länge aufgetrennt. Zur Detektion der DNA mittels UV-Licht wurde DNA-interkalierendes Ethidiumbromid (40 ng/mL) verwendet. Die DNA-Proben wurden vor der Gelelektrophorese, falls erforderlich, mit 6x Ladepuffer versetzt. Zur Längenbestimmung der DNA wurde ein DNA-Längenstandard verwendet.

2.9.4 Codon usage-Optimierung

Die Optimierung der *codon usage* von Gensequenzen wurde mit Hilfe der Internetseite www.jcat.de durchgeführt.

2.9.5 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Im ersten Schritt wurden die Oligonukleotide phosphoryliert. Ein Reaktionsansatz zur Phosphorylierung von Oligonukleotiden enthielt folgende Komponenten:

Tab. 12: Reaktionsansatz zur Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Komponente	Volumen	Menge
100 µM EJoligoHisTermf. bzw. EJoligoHisTermr.	3 µL	6 µM
10x T4 DNA-Ligase Puffer mit ATP	5 µL	1x
T4 Polynukleotidkinase	1 µL	10 U
dH ₂ O	ad 50 µL	

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und die T4 Polynukleotidkinase anschließend 20 min bei 65 °C deaktiviert.

Zur Hybridisierung der Oligonukleotide wurden die Phosphorylierungsansätze der Oligonukleotide vereinigt und nach folgendem Schema inkubiert:

Tab. 13: Programm zur Hybridisierung von Oligonukleotiden

Temperatur	Inkubationszeit
95 °C	3 min
84 °C (theoretische Hybridisierungstemperatur)	1 min
55 °C	1 min
4 °C	∞

2.9.6 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit die Zielregion flankierenden Oligonukleotiden durchgeführt. Als *template* wurden Plasmid-DNA oder Bakterien eingesetzt. Eine PCR wurde mit folgenden Komponenten und Temperaturverlauf durchgeführt:

Tab. 14: Reaktionsansatz einer PCR mit Combizyme DNA-Polymerase

Komponente	Volumen	Menge
10x OptiPerform Buffer III	5 µL	1x
50 mM MgCl ₂	2,5 µL	2,5 mM
10 µM Oligonukleotid f.	2 µL	0,4 µM
10 µM Oligonukleotid r.	2 µL	0,4 µM
Plasmid-DNA	1 µL	10 ng – 100 ng
10 mM dNTPs	2 µL	je 0,4 mM
Combizyme DNA-Polymerase	0,5 µL	2 U
dH ₂ O	ad 50 µL	

Tab. 15: Temperaturverlauf einer PCR mit Combizyme DNA-Polymerase

Zyklenzahl	Temperatur	Inkubationszeit
1	95 °C	2 min
30	95 °C	1 min
	47 °C	30 s
	72 °C	1 min
1	72 °C	5 min

Tab. 16: Reaktionsansatz einer PCR mit Phusion DNA-Polymerase

Komponente	Volumen	Menge
5x Phusion HF Reaction Buffer	10 µL	1x
10 µM Oligonukleotid f.	2 µL – 2,5 µL	0,4 µM – 0,5 µM
10 µM Oligonukleotid r.	2 µL – 2,5 µL	0,4 µM – 0,5 µM
Plasmid-DNA	0,5 µL – 2 µL	1 ng – 100 ng
10 mM dNTPs	1 µL	je 0,2 mM
Phusion DNA-Polymerase	0,5 µL	1 U
dH ₂ O	ad 50 µL	

Tab. 17: Temperaturverlauf einer PCR mit Phusion DNA-Polymerase

Zyklenzahl	Temperatur	Inkubationszeit
1	98 °C	30 s
25 – 30	98 °C	10 s
	38 °C – 65 °C	15 s – 30 s
	72 °C	30 s – 1 min
1	72 °C	10 min

Tab. 18: Reaktionsansatz einer PCR mit RedTaq DNA-Polymerase

Komponente	Volumen	Menge
10x RedTaq PCR Reaction Buffer	5 µL	1x
10 µM Oligonukleotid f.	0,5 µL	0,1 µM
10 µM Oligonukleotid r.	0,5 µL	0,1 µM
Bakterien	1 µL	
10 mM dNTPs	1 µL	je 0,2 mM
RedTaq DNA-Polymerase	1 µL	1 U
dH ₂ O	ad 50 µL	

Tab. 19: Temperaturverlauf einer PCR mit RedTaq DNA-Polymerase

Zyklenzahl	Temperatur	Inkubationszeit
1	94 °C	1,5 min
30	94 °C	1 min
	47 °C	1 min
	72 °C	1 min
1	72 °C	10 min

Die Hybridisierungstemperatur richtet sich nach der Zusammensetzung der Oligonukleotide und die Elongationszeit nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die theoretische Hybridisierungstemperatur (T_M) wurde den

Datenblättern des Herstellers entnommen oder mit folgender Gleichung (Gleichung 1) berechnet:

$$T_M = 64,9^{\circ}\text{C} + 0,41^{\circ}\text{C} \times (\%_{GC}) - \frac{650^{\circ}\text{C}}{n} \quad \text{Gleichung 1}$$

T_M : theoretische Hybridisierungstemperatur in $^{\circ}\text{C}$

$\%_{GC}$: GC-Gehalt des Oligonukleotids in %

n : Anzahl der Basen des Oligonukleotids

Eine PCR ohne *template*-DNA, bei der überlappende Oligonukleotide verwendet wurden, wurde mit folgenden Komponenten und Temperaturverlauf durchgeführt:

Tab. 20: Reaktionsansatz einer PCR mit überlappenden Oligonukleotiden

Komponente	Volumen	Menge
5x Phusion HF Reaction Buffer	10 μL	1x
10 μM EJopSplipAf.	2,5 μL	0,5 μM
10 μM EJopSplipAr.	2,5 μL	0,5 μM
10 mM dNTPs	1 μL	je 0,2 mM
Phusion DNA-Polymerase	0,5 μL	1 U
dH ₂ O	ad 50 μL	

Tab. 21: Temperaturverlauf einer PCR mit überlappenden Oligonukleotiden

Zyklenzahl	Temperatur	Inkubationszeit
1	98 $^{\circ}\text{C}$	30 s
30	98 $^{\circ}\text{C}$	10 s
	60 $^{\circ}\text{C}$	15 s
	72 $^{\circ}\text{C}$	15 s
1	72 $^{\circ}\text{C}$	5 min

2.9.7 Generierung von A-Überhängen an DNA-Fragmenten

Da durch die 3' – 5'-Exonukleaseaktivität mancher DNA-Polymerasen keine A-Überhänge an den PCR-Produkten vorhanden waren, mussten diese, wenn benötigt, durch eine DNA-Polymerase ohne 3' – 5'-Exonukleaseaktivität generiert werden. Hierfür wurden folgende Komponenten verwendet:

Tab. 22: Reaktionsansatz zur Generierung von A-Überhängen an DNA-Fragmenten

Komponente	Volumen	Menge
5x Colorless GoTaq Flexi Buffer	10 µL	1x
25 mM MgCl ₂	4 µL	2 mM
PCR-Produkt	30 µL	1 µg – 2 µg
10 mM dATP	1 µL	0,2 mM
GoTaq Flexi DNA-Polymerase	0,5 µL	2,5 U
dH ₂ O	ad 50 µL	

Der Reaktionsansatz wurde für 20 min bei 72 °C inkubiert.

2.9.8 Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden aus Lösungen oder Agarosegelen mit dem *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* oder mit dem *DNA Purification Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.9.9 Restriktion von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen des Typs II in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers. Die Restriktionsendonukleasen wurden anschließend für 20 min bei 65 °C deaktiviert.

2.9.10 Dephosphorylierung endständiger 5'-DNA-Phosphatgruppen

Zur Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten nach einer Restriktion wurden dem Restriktionsansatz 1 U *Shrimp alkaline phosphatase* (SAP) oder 10 U *Calf intestinal alkaline phosphatase* (CIP) zugesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die SAP wurde anschließend 15 min bei 65 °C deaktiviert.

2.9.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4 DNA-Ligase verwendet. Das molare Verhältnis zwischen Vektor und zu inserierenden DNA-Fragment betrug 1:3. Für einen Ligationsansatz wurden folgende Komponenten verwendet:

Tab. 23: Reaktionsansatz einer Ligation

Komponente	Volumen	Menge
10x Ligase Buffer	1 µL bzw. 2 µL	1x
Vektor-DNA	1,6 µL – 12 µL	50 ng – 100 ng
<i>Insert</i> -DNA	1 µL – 2, 6 µL	3:1 molar zu Vektor
T4 DNA-Ligase	1 µL	3 U
dH ₂ O	ad 10 µL bzw. 20 µL	

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert. Für die Berechnung der Menge des zu inserierenden DNA-Fragments wurde folgende Gleichung (Gleichung 2) verwendet:

$$\frac{Vektor[ng] \times Insert[kb]}{Vektor[kb]} \times \text{Verhältnis} \frac{Insert}{Vektor} = Insert[ng] \quad \text{Gleichung 2}$$

Vektor [ng]: eingesetzte Menge an Vektor in ng

Insert [ng]: einzusetzende Menge der zu inserierenden DNA in ng

Vektor [kb]: Größe des Vektors in kb

Insert [kb]: Größe der zu inserierenden DNA in kb

Bei Ligationsansätzen mit hybridisierten Oligonukleotiden wurde 1 µL von verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000) der hybridisierten Oligonukleotide eingesetzt.

2.9.12 TOPO TA-Klonierung

TOPO TA-Klonierungen wurden mit dem *TOPO TA Cloning Kit* durchgeführt. Es wurden 4 µL DNA-Fragment mit A-Überhängen mit 1 µL *Salt Solution* und 1 µL pCR2.1-TOPO-Vektor 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der linearisierte

Vektor besaß T-Überhänge und eine kovalent gebundene Topoisomerase I für die Insertion des DNA-Fragments.

2.9.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mittels eines modifizierten Kettenabbruchverfahrens nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Eine PCR wurde mit folgenden Komponenten und Temperaturverlauf durchgeführt:

Tab. 24: Reaktionsansatz einer Sequenzierungs-PCR

Komponente	Volumen	Menge
5x BigDye Terminator v1.1/v3.1 Sequencing Buffer	2 µL	1x
10 µM Oligonukleotid	1 µL	1 µM
DNA-Fragment/Plasmid	0,5 µL – 4 µL	30 ng (DNA-Fragment), 300 ng (Plasmid)
BigDye Terminator v1.1 dH ₂ O	1 µL – 2 µL ad 10 µL	

Tab. 25: Temperaturverlauf einer Sequenzierungs-PCR

Zyklenzahl	Temperatur	Inkubationszeit
1	96 °C	1 min
26	96 °C	30 s
	38 °C – 50 °C	15 s
	60 °C	4 min

Der Reaktionsansatz wurde in 90 µL Wasser aufgenommen und zum Präzipitieren der DNA mit 10 µL Natriumacetatlösung, 20 µg Glycogen und 250 µL Ethanol 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 16000 xg und 4 °C wurde der Überstand verworfen und die präzipitierte DNA zweimal mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA getrocknet, in 15 µL *HiDi*-Lösung resuspendiert und 2 min bei 90 °C denaturiert. Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

2.10 Proteinbiochemische Methoden

2.10.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in Abhängigkeit von ihrer molaren Masse unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS im elektrischen Feld aufgetrennt (Lämmli, 1970). Bei einer diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine in einem großporigen Sammelgel fokussiert und dann in einem kleinporigen Trenngel aufgetrennt. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurden 10%ige oder 12%ige Trenngele verwendet. Die Proteinproben wurden mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde mit 20 mA durchgeführt. Zur Bestimmung der Masse der Proteine wurde ein Massenstandard verwendet.

2.10.2 Coomassiefärbung von Proteinen

Zur Coomassiefärbung der Proteine wurden die SDS-Gele 30 min in Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele so lange in Entfärbelösung inkubiert, bis eine Entfärbung der proteinfreien Gelmatrix vorlag. Um die SDS-Gele zu konservieren, wurden die Gele zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet.

2.10.3 Immunoblot

Western-Blot

Der Western-Blot ist ein Verfahren, bei dem Proteine aus einem SDS-Gel auf eine Membran übertragen werden. Hierzu wurde ein mit Laufpuffer getränktes Filterpapier, eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran, das SDS-Gel und ein weiteres in Laufpuffer getränktes Filterpapier auf die Blot-Apparatur aufgelegt. Der Transfer der Proteine auf die Membran fand bei 350 mA pro Gel bei maximal 20 V für 40 min statt.

Immunfärbung

Bei der Immunfärbung werden Proteine auf einer Membran spezifisch mittels alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelter Antikörper nachgewiesen. Hierzu wurden die PVDF-Membranen nach dem Western-Blot 1,5 h in 3%igem MPBS abgestättigt und für 5 min mit 0,1%igem PBST gewaschen. Anschließend wurden die Membranen 1,5 h mit dem Erstantikörper Maus anti-His₅ (1:2000 in 3%igem MPBS verdünnt) inkubiert und zweimal mit 0,1%igem PBST und einmal mit PBS für 5 min gewaschen. Nach diesen Waschschritten wurden die Membranen 1,5 h mit dem Zweitantikörper Ziege anti-Maus IgG AP (Fab bzw. Fc spezifisch, 1:5000 in 3%igem MPBS verdünnt) inkubiert, wie zuvor gewaschen und 5 min in Substratpuffer inkubiert. Die Membranen wurden daraufhin in Substratlösung inkubiert, bis eine ausreichende Färbung vorhanden war. Zum Abstoppen der Reaktion wurde mit Wasser gewaschen.

2.10.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen, bei der der Farbstoff Coomassie an Proteine bindet und dadurch das Absorptionsspektrum des Farbstoffs verschoben wird. Für die Konzentrationsbestimmung wurde die *Protein Assay*-Lösung 1:5 mit Wasser verdünnt eingesetzt. Der Antikörper Herceptin wurde für die Kalibriergerade in Konzentrationen zwischen 1 µg/mL und 100 µg/mL verwendet. Der aufgereinigte D1.3 scFv wurde in Verdünnungen bis zu 1:32 vermessen. Zu 150 µL Proteinlösung wurden 150 µL *Protein Assay*-Lösung zugegeben und die Absorption bei 595 nm gemessen. Die D1.3 scFv-Konzentration wurde mittels der Kalibriergerade berechnet.

2.10.5 Densitometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Bei der densitometrischen Konzentrationsbestimmung wird die Proteinkonzentration mittels der Stärke der Coomassiefärbung der Proteine in einem SDS-Gel bestimmt. Für die Kalibriergerade wurde bovines Serumalbumin (BSA) oder der

TM44-C7.3 scFv in Mengen von 0,02 µg bis 1,5 µg verwendet. Von den aufgereinigten Antikörperfragmenten wurden 10 µL eingesetzt. Die Stärke der Coomassiefärbung der Proteinbanden im SDS-Gel wurde mit dem Computerprogramm ImageJ bestimmt. Die Konzentration der Antikörperfragmente wurde mittels der Kalibriergerade berechnet.

2.10.6 Antigen-ELISA

Bei einem Antigen-ELISA können funktionelle Antikörper bzw. Antikörperfragmente spezifisch mittels Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelter Antikörper nachgewiesen werden. Hierzu wurden je 100 µL des jeweiligen Antigens (Lysozym 10 µg/mL in PBS, C-reaktives Protein (CRP) 1 µg/mL in PBS) in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend dreimal mit 0,05%igem PBST gewaschen und die Vertiefungen mit je 320 µL 2%igem MPBST für 1,5 h abgesättigt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden je 100 µL Antikörperfragmentlösung in den mit Antigen beschichteten Vertiefungen 1,5 h inkubiert. Bei der Antikörperfragmentlösung handelte es sich entweder um 1:2 mit 2%igem MPBST verdünnten Kulturüberstand oder um mit 2%igem MPBST verdünntes aufgereinigtes Antikörperfragment. Die Vertiefungen wurden nach einem Waschschrift mit je 100 µL Maus anti-His₅ Antikörper (1:10000 in 2%igem MPBST) 1,5 h inkubiert und erneut gewaschen. Anschließend wurden je 100 µL Ziege anti-Maus IgG HRP Antikörper (Fab bzw. Fc spezifisch, 1:10000 in 2%igem MPBST) 1,5 h in den Vertiefungen inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Farbreaktion mit je 100 µL Substratlösung pro Vertiefung durchgeführt. Die Farbreaktion wurde mit je 100 µL 1 N Schwefelsäure pro Vertiefung gestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm und 620 nm gemessen. Von der Absorption bei 450 nm wurde die Absorption bei 620 nm subtrahiert.

2.10.7 Periplasmapräparation

Für die Periplasmapräparation wurde eine *E. coli*-Kultur 15 min bei 4225 xg und 4 °C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 1/10 Volumen (bezogen auf das Kulturvolumen) kaltem Schockpuffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Hierbei wurde die Bakteriensuspension in 2 min Abständen gemischt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 30 min bei 30400 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Periplasmapräparation.

2.10.8 Präzipitation von Proteinen mit Ammoniumsulfat

Für die Präzipitation von Proteinen aus dem Kulturüberstand wurde die Bakterienkultur 15 min bei 3250 xg – 4225 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 44 % (w/v) Ammoniumsulfat 1 – 2 h rührend oder im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine 30 min bei 13500 – 16000 xg und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Proteinsediment wurde in 1/30 – 1/150 Volumen (bezogen auf das Kulturvolumen) Wasser oder PBS resuspendiert.

2.10.9 Dialyse von proteinhaltigen Lösungen

Die Periplasmapräparationen, präzipitierten Kulturüberstände und Elutionsfraktionen der Aufreinigungen wurden über Nacht bei 4 °C gegen 3 – 4 L PBS dialysiert.

2.10.10 Aufreinigung von Antikörperfragmenten mittels *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC)

Die IMAC ist ein chromatographisches Trennverfahren zur Aufreinigung von Proteinen mit His-Tag. Die Histidine binden hierbei an immobilisierte Nickelionen.

Beladen der Sepharosematrix mit Nickelionen

Das Immobilisieren der Nickelionen an der *Chelating Sepharose Fast Flow* wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

IMAC

Für die IMAC wurden der präzipitierte und dialysierte *B. megaterium*-Kulturüberstand bzw. der präzipitierte und dialysierte *E. coli*-Kulturüberstand und die dialysierte Periplasmapräparation, die vereinigt wurden, verwendet. Diesen antikörperfragmenthaltigen Fraktionen wurde Imidazol (10 mM) und NaCl (500 mM) zugegeben. Nach Bedarf wurde der präzipitierte *B. megaterium*-Kulturüberstand 1:3 mit Bindepuffer verdünnt. Die antikörperfragmenthaltigen Fraktionen wurden mit 0,5 mL mit Nickelionen beladener Sepharose 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde 3 min bei 500 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen wurde die Sepharose in 3,75 mL Bindepuffer resuspendiert und 5 min bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert und 3 min bei 500 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Sepharose in 3,75 mL Waschpuffer mit 20 bzw. 50 mM Imidazol resuspendiert. Nach einem weiteren Inkubations- und Zentrifugationsschritt wurde die Sepharose in 3,75 mL Waschpuffer mit 50 mM Imidazol resuspendiert und abermals 5 min bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde die Sepharose in 3,75 mL PBS resuspendiert und wieder auf dem Überkopfschüttler inkubiert und zentrifugiert. Zur Elution der Antikörperfragmente wurde die Sepharose zweimal in 1,5 mL Elutionspuffer 1 und einmal in 1,5 mL Elutionspuffer 2 resuspendiert, auf dem Überkopfschüttler inkubiert und zentrifugiert. Für die Analyse der Aufreinigung mittels SDS-PAGE und Immunoblot wurden je 8 µL der verschiedenen Fraktionen verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion der *B. megaterium*-Expressionsvektoren

3.1.1 Konstruktion des Vektors pEJBmopSplipA

Für die Klonierung und Expression von Antikörperfragmentgenen wurde ein *B. megaterium* Vektor auf Basis des Vektors pHIS1525 (Malten *et al.*, 2006) konstruiert. Hierfür wurde der Terminator T4 (Raux *et al.*, 1998), eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle und eine Sequenz, die den His₆-Tag kodiert mittels der hybridisierten Oligonukleotide EJoligoHisTermf. und EJoligoHisTermr. und den Restriktionsschnittstellen *SphI* und *AgeI* in den Vektor pHIS1525 in *E. coli* DH5 α kloniert. Im nächsten Schritt wurde ein noch vorhandener Rest des *E. coli*-Tetracyclinresistenzgens durch Restriktion mit dem Enzym *AflI* und Religation entfernt. Anschließend wurde die Gensequenz für das Signalpeptid der extrazellulären Lipase LipA von *B. megaterium* (Ruiz *et al.*, 2002) mit optimierter *codon usage* sowie eine *NheI*-Schnittstelle mittels PCR mit den überlappenden Oligonukleotiden EJopSplipAf. und EJopSplipAr. amplifiziert und mittels der Enzyme *BglI* und *BsrGI* in den Vektor in *E. coli* DH5 α kloniert. Der resultierende Vektor pEJBmopSplipA (Abb. 5) wurde als Ausgangsplasmid für die Klonierung von Antikörperfragmentgenen verwendet.

3.1.2 Konstruktion der Vektoren pEJBmD1.3scFv und pEJBmLA13-IIE3scFv

Der Vektor pEJBmD1.3scFv (Abb. 5) bzw. pEJBmLA13-IIE3scFv für die Produktion und Sekretion des Hühnereiweißlysozym spezifischen scFv-Fragments D1.3 bzw. CRP spezifischen scFv-Fragments LA13-IIE3 wurde ausgehend von dem *B. megaterium*-Basisvektor pEJBmopSplipA konstruiert. Das scFv-Genfragment, das den murinen Antikörper D1.3 bzw. den humanen Antikörper LA13-IIE3 kodiert, wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden EJD1.3Nhelf. und EJD1.3r. bzw. EJCRPIIE3f. und EJCRPIIE3r. aus dem Vektor pHAL1-D1.3scFv

(Hust *et al.*, 2007) bzw. pIT2-CRP-IIE3 (zur Verfügung gestellt von L. Al-Halabi, AG Dübel) amplifiziert und mittels der Restriktionsschnittstellen *NheI* und *NotI* in den Vektor pEJBmopSplipA in *E. coli* DH10B::pMMEc4 kloniert. Ein effizientes Klonieren von scFv-Genen in *E. coli* konnte durch Kotransformation mit dem Vektor pMMEc4 (Jordan *et al.*, 2007), der das Xyloserepressorgen *xylR* unter der Kontrolle eines Arabinosepromotors trägt, erreicht werden. Die kontinuierliche *xylR*-Expression führte zu einer Repression des normalerweise in *E. coli* nicht reprimierten *B. megaterium*-*xylA*-Promotors. Das *xylR*-Gen auf den *B. megaterium*-Expressionsvektoren wurde dagegen wahrscheinlich nur von *B. megaterium* exprimiert.

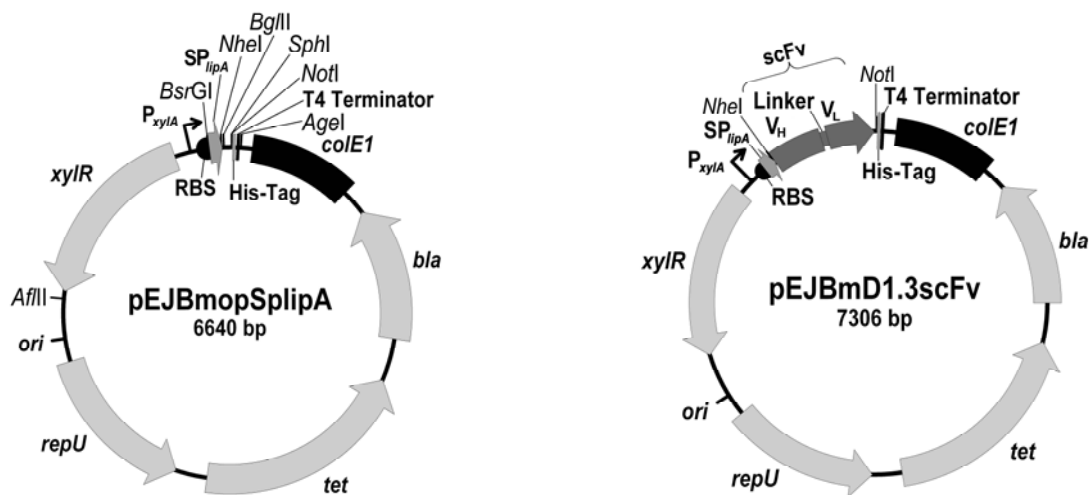


Abb. 5: Vektorkarten von pEJBmopSplipA und pEJBmD1.3scFv. *colE1*: *E. coli*-Replikationsursprung; *bla*: β -Laktamasegen für Ampicillinresistenz; *tet*: Tetracyclinresistenzgen; *repU*: Gen für Plasmidreplikation in *B. megaterium*; *ori*: *B. megaterium*-Replikationsursprung; *xylR*: Gen für Xyloserepressor; P_{xylA} : Xylose-induzierbarer Promotor; RBS: Ribosomenbindestelle; SP_{lipA} : Signalpeptidsequenz der extrazellulären Lipase LipA aus *B. megaterium*; V_H : Kodierende Sequenz für die variable Domäne der schweren Kette; Linker: Kodierende Sequenz für einen Peptidlinker; V_L : Kodierende Sequenz für die variable Domäne der leichten Kette; His-Tag: Tag aus sechs Histidinen; T4 Terminator: Sequenz zur Beendigung der Transkription; *AfII*, *BsrGI*, *NheI*, *BglII*, *SphI*, *NotI*, *Agel*: Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen

3.1.3 Konstruktion des Vektors pEJBmD1.3scFab Δ C

Das D1.3 scFab Δ C-Genfragment des Vektors pEJBmD1.3scFab Δ C (Abb. 6) wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden EJD1.3scFabf. und EJD1.3scFabr. aus dem Vektor pHAL1-D1.3scFab Δ C (Hust *et al.*, 2007) amplifiziert und in den Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) in *E. coli* DH5 α kloniert. Aus diesem Vektor wurde das scFab-Genfragment mittels der Restriktionsendonukleasen *NheI* und *NotI* ausgeschnitten und in den Vektor pEJBmopSplipA ligiert und in *E. coli* DH5 α ::pMMec4 transformiert. Bei dieser Klonierung traten häufig, trotz Kotransformation mit dem Vektor pMMec4, Mutationen im 5'-Bereich des Antikörperfragmentgens auf. Bei den Mutationen waren Deletionen, die zu Leserasterverschiebungen führten, vorherrschend (Abb. 7).

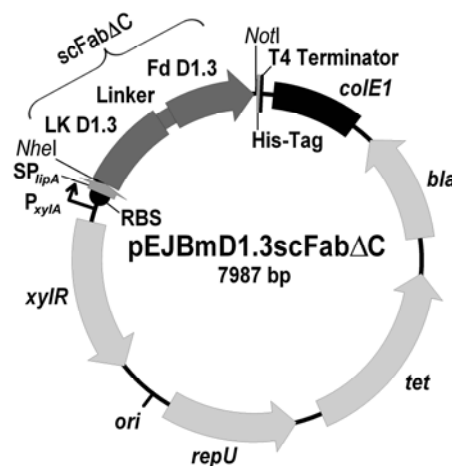


Abb. 6: Vektorkarte von pEJBmD1.3scFab Δ C. *colE1*: *E. coli*-Replikationsursprung; *bla*: β -Laktamasegen für Ampicillinresistenz; *tet*: Tetracyclinresistenzgen; *repU*: Gen für Plasmidreplikation in *B. megaterium*; *ori*: *B. megaterium*-Replikationsursprung; *xylR*: Gen für Xyloserepressor; *P_{xylA}*: Xylose-induzierbarer Promotor; RBS: Ribosomenbindestelle; *SP_{lipA}*: Signalpeptidsequenz der extrazellulären Lipase LipA aus *B. megaterium*; LK D1.3: Kodierende Sequenz für die leichte Kette; Linker: Kodierende Sequenz für einen Peptidlinker; Fd D1.3: Kodierende Sequenz für die variable Domäne und die erste konstante Domäne (C_{H1}) der schweren Kette; His-Tag: Tag aus sechs Histidinen; T4 Terminator: Sequenz zur Beendigung der Transkription; *NheI*, *NotI*: Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen



Abb. 7: Zusammenfassung der Deletionen im Gen der leichten Kette des D1.3 scFabΔC.

SP_{lipA}: Signalpeptidsequenz der extrazellulären Lipase LipA aus *B. megaterium*; LK D1.3:

Kodierende Sequenz für die leichte Kette

3.2 Optimierung der Parameter für die D1.3 scFv-Produktion in *B. megaterium*

Die Produktion von Antikörperfragmenten in *B. megaterium* wurde anhand des anti-Lysozym Antikörpers D1.3 (Ward *et al.*, 1989; Skerra, 1994, Kirsch *et al.*, 2005) im scFv-Format getestet. Mit Hilfe des Modell-Antikörpers wurden Produktionsparameter wie Temperatur, Medium und Dauer im 100 mL-Maßstab im Schüttelkolben schrittweise optimiert.

3.2.1 Optimierung der Produktionstemperatur (LB-Medium)

Der Einfluss der Temperatur auf die Xylose-induzierbare Produktion des D1.3 scFv in *B. megaterium* wurde als erster Parameter analysiert. Acht verschiedene Temperaturen zwischen 23 °C und 45 °C wurden unter Verwendung von LB-Medium untersucht. Nach einer Expressionsdauer von 24 h wurde die OD₆₀₀ bestimmt (Tab. 26) und die Kulturüberstände mittels ELISA (Abb. 8) und Immunoblot (Abb. 9) analysiert. Die höchsten Zelldichten wurden bei einer Produktionstemperatur von 30 °C – 39 °C gemessen. Die größte Menge an funktionellem scFv konnte bei einer Temperatur von 41 °C produziert werden, wohingegen die größte Gesamtausbeute an scFv bei Temperaturen zwischen 37 °C und 41 °C mittels Immunoblot nachgewiesen wurde.

Tab. 26: Einfluss der Temperatur auf die Zelldichte (OD_{600}) einer D1.3 scFv produzierenden *B. megaterium*-Kultur (LB-Medium). Die Daten stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen dar.

	23 °C	30 °C	37 °C	39 °C	41 °C	42 °C	43 °C	45 °C
OD_{600} 24 h nach Induktion	3,4±0,48	5,18±0,41	5,14±0,16	5,18±0,15	4,66±0,2	4,51±0,11	3,45±0,37	2,86±0,18

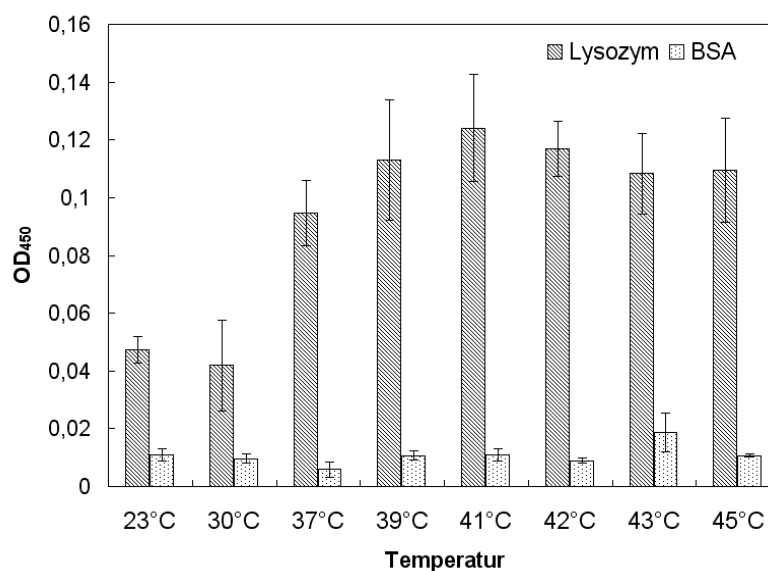


Abb. 8: Einfluss der Temperatur auf die D1.3 scFv-Produktion mit LB-Medium: ELISA. Die Produktion von funktionellen D1.3 scFv wurde mittels eines ELISA mit je 50 μ L Kulturüberstand nach 24 h Produktion im 100 mL-Maßstab (Schüttelkolben) analysiert. Die Daten stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen dar. Antigen: 1 μ g/Vertiefung Lysozym oder 1 μ g/Vertiefung BSA (Kontrolle). Der D1.3 scFv wurde detektiert durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG HRP (Fab spezifisch) Antikörper.

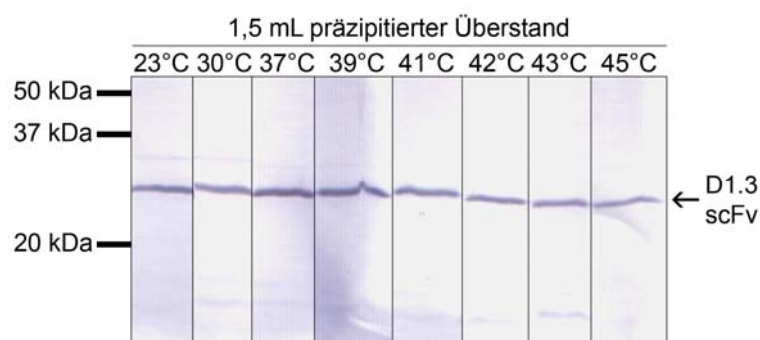


Abb. 9: Einfluss der Temperatur auf die D1.3 scFv-Produktion mit LB-Medium: Immunoblot. Immunoblot der produzierten D1.3 scFvs. Die scFvs wurden aus je 1,5 mL Kulturüberstand aus einer 24 h-Produktion im 100 mL-Maßstab (Schüttelkolben) mit Ammoniumsulfat präzipitiert und mit einer reduzierenden SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG AP (Fab spezifisch) Antikörper.

3.2.2 Optimierung der Produktionsdauer (LB-Medium)

Die optimale Dauer für die Produktion des D1.3 scFv in *B. megaterium* wurde bei 41 °C unter Verwendung von LB-Medium ermittelt. Die Probenentnahme und Bestimmung der OD₆₀₀ (Abb. 10) erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 0 h und 48 h nach der Induktion der Expression mit Xylose. Die Proben wurden mittels ELISA (Abb. 11) und Immunoblot (Abb. 12) analysiert. Nach 12 h erreichte die Bakterienkultur die stationäre Phase. ScFv-Fragmente im Kulturüberstand konnten mittels Immunoblot 2 h nach der Induktion nachgewiesen werden, wobei funktionelle scFvs mittels ELISA erst 6 h nach der Induktion detektiert werden konnten. Die Menge an sekretiertem scFv-Protein erhöhte sich kontinuierlich und erreichte 18 h nach der Induktion ihr Maximum. Danach nahm die Menge an funktionellem scFv ab, wohingegen die Gesamtausbeute an scFv konstant blieb.

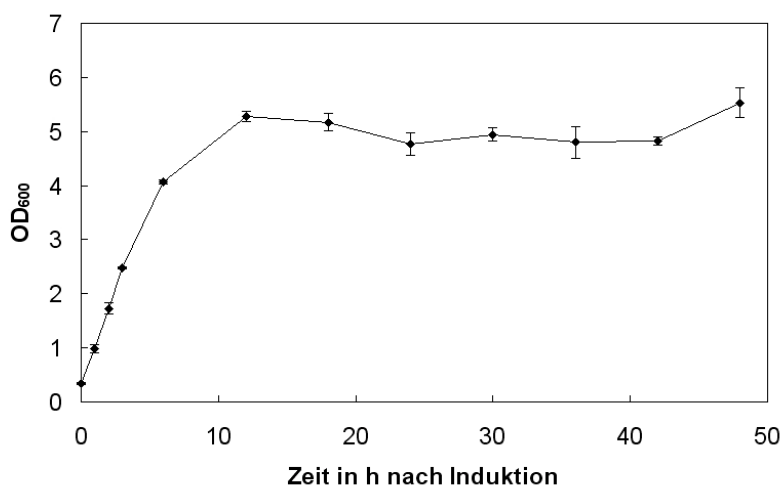


Abb. 10:Wachstumskurve einer D1.3 scFv produzierenden *B. megaterium*-Kultur (LB-Medium). Die Daten stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen dar.

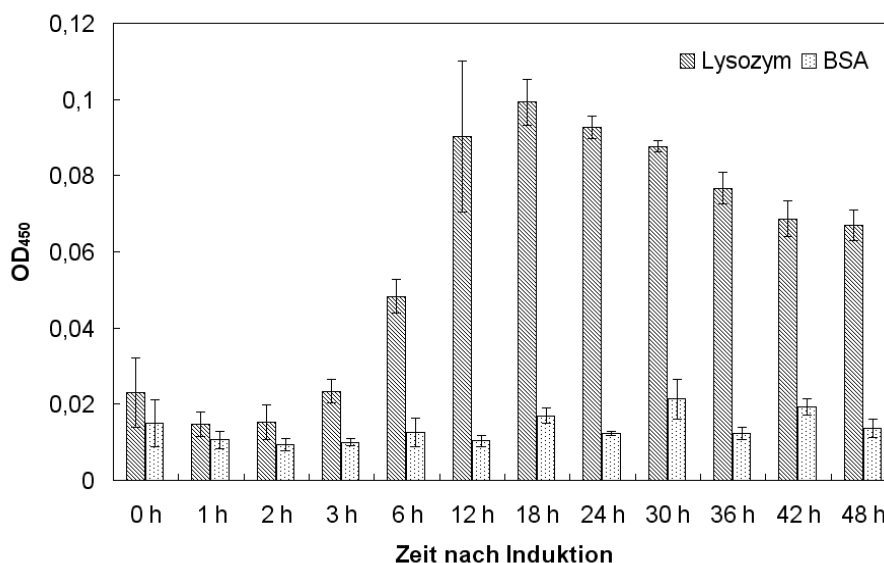


Abb. 11: Einfluss der Zeit auf die D1.3 scFv-Produktion mit LB-Medium: ELISA. Die Produktion von funktionellen D1.3 scFv wurde mittels eines ELISA mit je 50 μ L Kulturüberstand nach 0 h bis 48 h Produktion im 100 mL-Maßstab (Schüttelkolben) analysiert. Die Daten stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen dar. Antigen: 1 μ g/Vertiefung Lysozym oder 1 μ g/Vertiefung BSA (Kontrolle). Der D1.3 scFv wurde detektiert durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG HRP (Fab spezifisch) Antikörper.

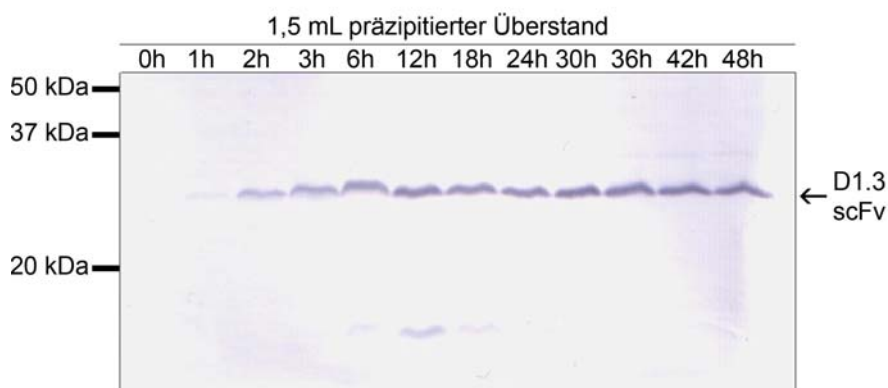


Abb. 12: Einfluss der Zeit auf die D1.3 scFv-Produktion mit LB-Medium: Immunoblot. Immunoblot der produzierten D1.3 scFvs. Die scFvs wurden aus je 1,5 mL Kulturüberstand nach 0 h bis 48 h Produktion im 100 mL-Maßstab (Schüttelkolben) mit Ammoniumsulfat präzipitiert und mit einer reduzierenden SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG AP (Fab spezifisch) Antikörper.

3.2.3 Optimierung des Mediums

Die D1.3 scFv-Produktion bei 41 °C für 18 h wurde in dem Minimalmedium M9, in dem semidefinierten Medium A5, in LB-Medium und in den reichhaltigen Medien 2xTY und TB untersucht. Die OD₆₀₀ der verschiedenen Bakterienkulturen wurde bestimmt (Tab. 27) und der sekretierte scFv auf Funktionalität mittels ELISA (Abb. 13) und in Bezug auf die Ausbeute, molare Masse und eventuelle Abbauprodukte mittels Immunoblot analysiert (Abb. 14). In den Medien M9 und A5 konnten keine funktionellen scFvs produziert werden, wohingegen mittels Immunoblot bei der Expression in A5-Medium schwache scFv-Produktion nachgewiesen werden konnte. Bei der Verwendung von LB-Medium konnte nur eine geringe Produktion von funktionellen scFv detektiert werden. Eine signifikante Produktion von funktionellem scFv konnte mit dem reichhaltigen Medium 2xTY erreicht werden. Die höchste Produktion und Zelldichte wurde unter Verwendung von TB-Medium erzielt, welches das reichhaltigste Medium innerhalb dieser Versuchsreihe war. Mittels Immunoblot konnte jedoch eine geringe Proteindegradation nachgewiesen werden.

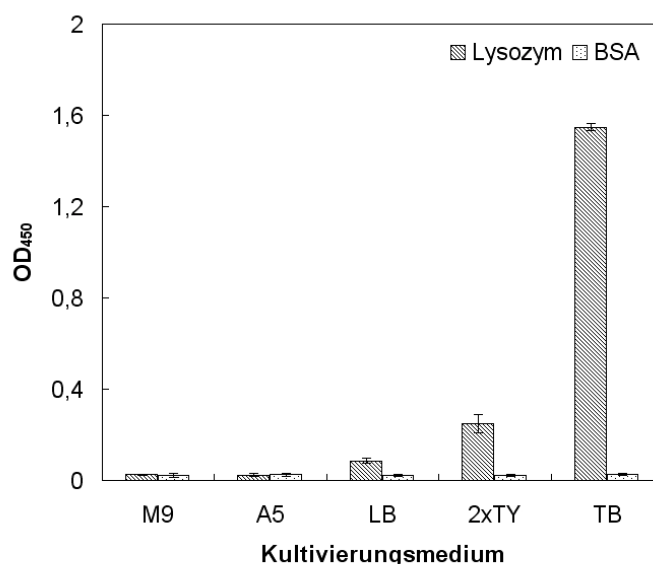


Abb. 13: Einfluss der verschiedenen Medien auf die D1.3 scFv-Produktion: ELISA. Die Produktion von funktionellen D1.3 scFv wurde mittels eines ELISA mit je 50 µL Kulturüberstand nach 18 h Produktion im 100 mL-Maßstab (Schüttelkolben) analysiert. Die Daten stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen dar. Antigen: 1 µg/Vertiefung Lysozym oder 1 µg/Vertiefung BSA (Kontrolle). Der D1.3 scFv wurde detektiert durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG HRP (Fab spezifisch) Antikörper.

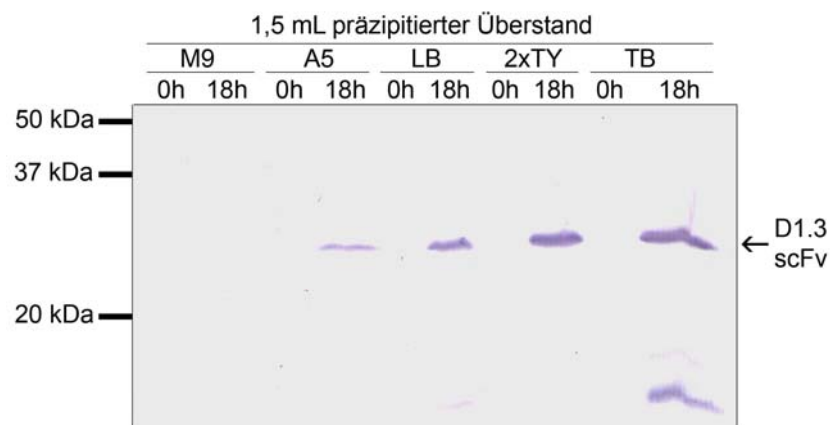


Abb. 14: Einfluss der verschiedenen Medien auf die D1.3 scFv-Produktion: Immunoblot.

Immunoblot der produzierten D1.3 scFvs. Die scFvs wurden aus je 1,5 mL Kulturüberstand nach 0 h und 18 h Produktion im 100 mL-Maßstab (Schüttelkolben) mit Ammoniumsulfat präzipitiert und mit einer reduzierenden SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG AP (Fab spezifisch) Antikörper.

Tab. 27: Einfluss der verschiedenen Medien auf die Zelldichte (OD₆₀₀) einer D1.3 scFv produzierenden *B. megaterium*-Kultur. Die Daten stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen dar.

	M9	A5	LB	2xTY	TB
OD ₆₀₀ 18 h nach Induktion	0,46±0,03	4,28±0,46	5,05±0,18	7,33±0,19	8,13±0,32

3.2.4 Optimierung der Produktionsdauer (TB-Medium)

Mittels LB-Medium wurden die optimalen Parameter für die scFv-Produktion bestimmt. Da jedoch TB-Medium besser für die scFv-Produktion geeignet war, mussten diese Parameter nochmals überprüft werden. Die optimale Produktionsdauer für scFvs in *B. megaterium* unter Verwendung von TB-Medium wurde bei 41 °C ermittelt. Die Probenentnahme und Bestimmung der OD₆₀₀ (Abb. 15) erfolgte wie zuvor zwischen 0 h und 48 h nach der Induktion der Expression mit Xylose. Die Proben wurden abermals mittels ELISA (Abb. 16) und Immunoblot (Abb. 17) analysiert. Nach 18 h erreichte die *B. megaterium*-Kultur die stationäre Phase. D1.3 scFv-Fragmente konnten im Kulturüberstand 6 h nach der Induktion sowohl im ELISA als auch im Immunoblot detektiert werden. Die größte Menge an sekretiertem, funktionellem D1.3 scFv wurde 24 h nach der Induktion

nachgewiesen. Bei einer längeren Kultivierungsdauer nahm die Menge an funktionellem scFv leicht ab, während die totale Menge der Antikörperfragmente immer noch stieg. Nach 6 h Produktion konnten erste Abbauprodukte der Antikörperfragmente detektiert werden. Bei Verwendung von TB-Medium erhöhte sich die optimale Produktionsdauer von 18 h auf 24 h nach der Induktion.

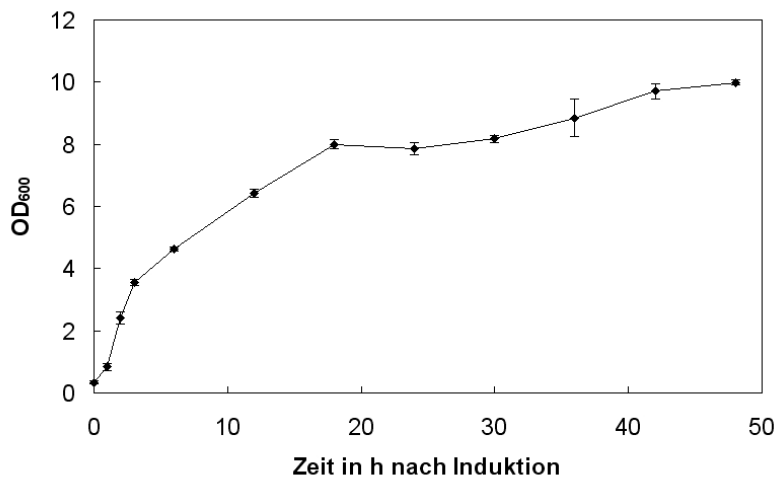


Abb. 15: Wachstumskurve einer D1.3 scFv produzierenden *B. megaterium*-Kultur (TB-Medium). Die Daten stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen dar.

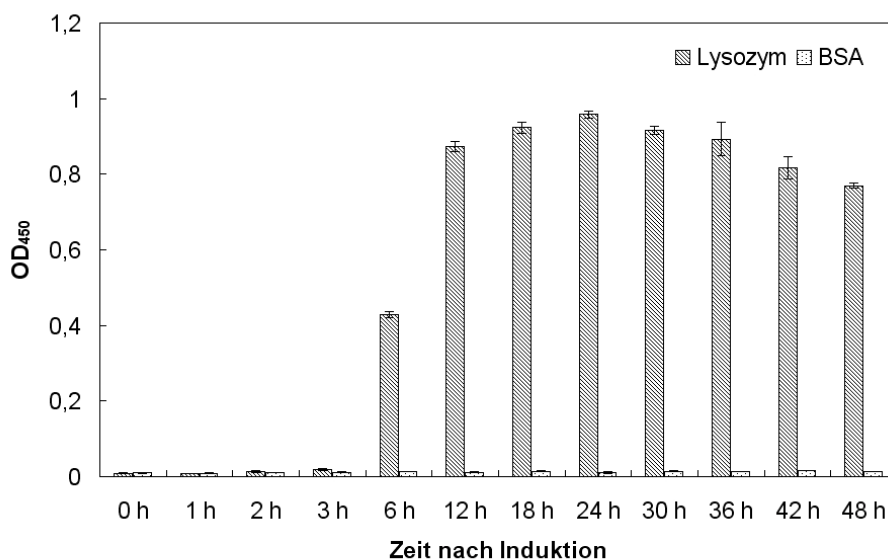


Abb. 16: Einfluss der Zeit auf die D1.3 scFv-Produktion mit TB-Medium: ELISA. Die Produktion von funktionellen D1.3 scFv wurde mittels eines ELISA mit je 50 μ L Kulturüberstand nach 0 h bis 48 h Produktion im 100 mL-Maßstab (Schüttelkolben) analysiert. Die Daten stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen dar. Antigen: 1 μ g/Vertiefung Lysozym oder 1 μ g/Vertiefung BSA (Kontrolle). Der D1.3 scFv wurde detektiert durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG HRP (Fab spezifisch) Antikörper.

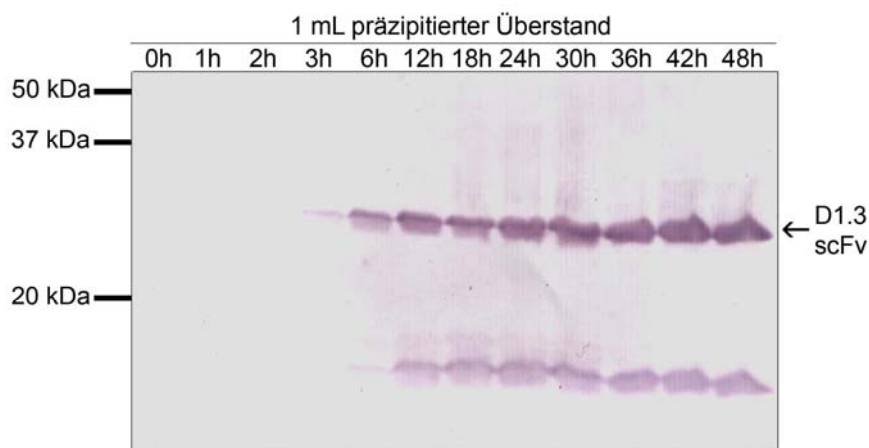


Abb. 17: Einfluss der Zeit auf die D1.3 scFv-Produktion mit TB-Medium: Immunoblot.

Immunoblot der produzierten D1.3 scFvs. Die scFvs wurden aus je 1 mL Kulturüberstand nach 0 h bis 48 h Produktion im 100 mL-Maßstab (Schüttelkolben) mit Ammoniumsulfat präzipitiert und mit einer reduzierenden SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG AP (Fab spezifisch) Antikörper.

3.2.5 Optimierung der Produktionstemperatur (TB-Medium)

Der Einfluss der Temperatur auf die Produktion des D1.3 scFv in *B. megaterium* wurde zusätzlich mit TB-Medium untersucht. Sechs verschiedene Temperaturen zwischen 30 °C und 45 °C wurden analysiert. Die Probenentnahme und Bestimmung der OD₆₀₀ (Tab. 28) erfolgte bei 6 h und 24 h. Die höchste Zelldichte wurde nach 24 h bei einer Produktionstemperatur von 30 °C erreicht. Die Menge an funktionellen D1.3 scFv im Kulturüberstand wurde mittels ELISA auf Lysozym (Abb. 18) untersucht, wobei die größte Menge an funktionellem scFv nach 6 h Produktion bei einer Produktionstemperatur von 41 °C nachgewiesen werden konnte. 24 h nach der Induktion wurde die größte Menge an funktionellem D1.3 scFv bei einer Produktionstemperatur zwischen 37 °C und 43 °C detektiert. Diese Ergebnisse wurden mittels Immunoblot bestätigt (Abb. 19). Bei Verwendung von TB-Medium ist ebenfalls eine Temperatur von 41 °C optimal für die Produktion von funktionellem scFv.

Tab. 28: Einfluss der Temperatur auf die Zelldichte (OD_{600}) einer D1.3 scFv produzierenden *B. megaterium*-Kultur (TB-Medium). Die Daten stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen dar.

	30 °C	37°C	39°C	41°C	43°C	45°C
OD_{600} 6 h nach Induktion	3,87±0,16	4,87±0,15	5,23±0,46	4,29±0,44	4,24±0,14	3,37±0,07
OD_{600} 24 h nach Induktion	11,1±0,3	9,07±0,22	9,62±0,36	7,59±0,37	6,97±0,22	7,37±0,24

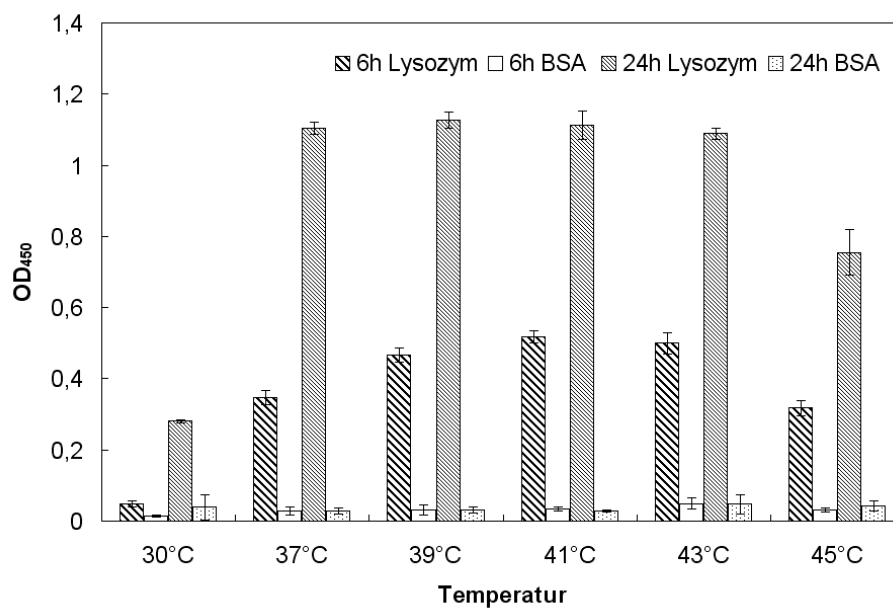


Abb. 18: Einfluss der Temperatur auf die D1.3 scFv-Produktion mit TB-Medium: ELISA. Die Produktion von funktionellen D1.3 scFv wurde mittels eines ELISA mit je 50 μ L Kulturüberstand nach 6h und 24 h Produktion im 100 mL-Maßstab (Schüttelkolben) analysiert. Die Daten stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen dar. Antigen: 1 μ g/Vertiefung Lysozym oder 1 μ g/Vertiefung BSA (Kontrolle). Der D1.3 scFv wurde detektiert durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG HRP (Fab spezifisch) Antikörper.

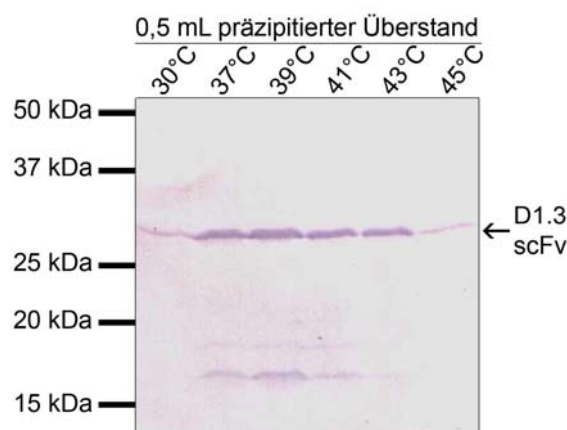


Abb. 19: Einfluss der Temperatur auf die D1.3 scFv-Produktion mit TB-Medium: Immunoblot.

Immunoblot der produzierten D1.3 scFvs. Die scFvs wurden aus je 0,5 mL Kulturüberstand aus einer 24 h-Produktion im 100 mL-Maßstab (Schüttelkolben) mit Ammoniumsulfat präzipitiert und mit einer reduzierenden SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG AP (Fab spezifisch) Antikörper.

3.3 Vergleich der Produktion des D1.3 scFv in *B. megaterium* und *E. coli*

Um die Produktion des D1.3 scFv in *B. megaterium* mit dem Produktionssystem *E. coli* zu vergleichen, wurde dieses Antikörperfragment im 3x 100 mL- bzw. 300 mL-Maßstab im Schüttelkolben produziert. Für die Produktion in *B. megaterium* wurden die optimierten Produktionsparameter verwendet. Die scFv-Ausbeuten wurden mittels Bradford-Test bestimmt. Es konnten 410 µg/L scFv aus dem Kulturüberstand von *B. megaterium* und 290 µg/L scFv aus dem Periplasma und Kulturüberstand von *E. coli* mittels IMAC aufgereinigt werden. Die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 20, 21).

In den Elutionsfraktionen der *E. coli*-Aufreinigung wurden mehr Verunreinigungen nachgewiesen, als in den Elutionsfraktionen der *B. megaterium*-Aufreinigung. Eine Verdünnungsreihe der von *B. megaterium* und *E. coli* hergestellten und aufgereinigten scFvs wurde mittels ELISA auf Lysozym untersucht (Abb. 22). Die scFvs, die in *B. megaterium* produziert wurden, zeigten eine höhere spezifische Antigenbindung verglichen mit den scFvs, die in *E. coli* produziert wurden. Aus

B. megaterium Kulturüberstand konnten somit scFv-Fragmente mit einer höheren Ausbeute, Reinheit und spezifischen Aktivität aufgereinigt werden als aus *E. coli*-Kulturüberstand und -Periplasma.

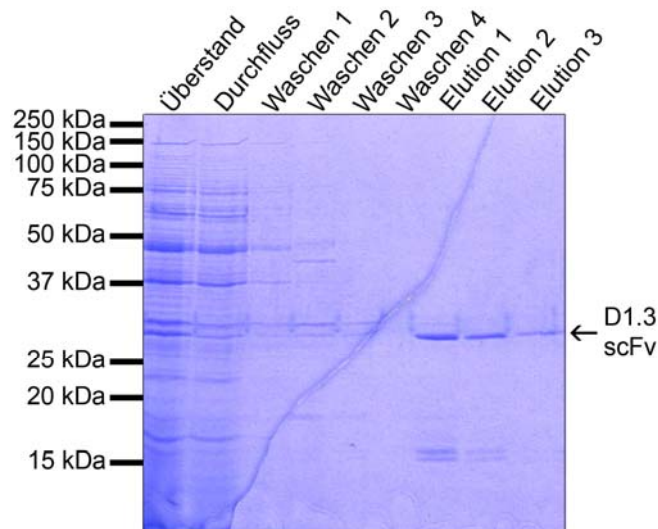


Abb. 20: Aufreinigung des D1.3 scFv mittels IMAC aus *B. megaterium*-Kulturüberstand.

Reduzierende SDS-PAGE (12 %) der D1.3 scFv-Aufreinigung aus präzipitiertem Überstand der *B. megaterium*-Produktion. Aufgetragen wurden der präzipitierte Überstand, der Durchfluss, die Wasch- und die Elutionsfraktionen.

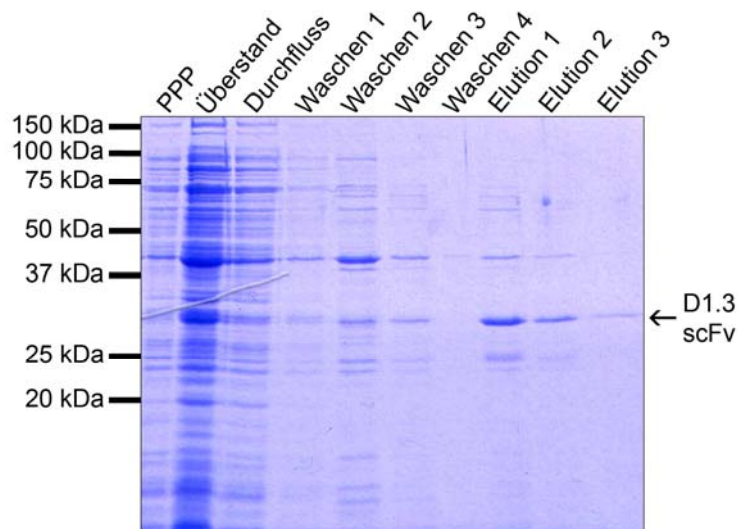


Abb. 21: Aufreinigung des D1.3 scFv mittels IMAC aus *E. coli*-Periplasma und

-Kulturüberstand. Reduzierende SDS-PAGE (12 %) der D1.3 scFv-Aufreinigung aus der Periplasmapräparation und dem präzipitierten Überstand der *E. coli*-Produktion. Aufgetragen wurden die Periplasmapräparation (PPP), der präzipitierte Überstand, der Durchfluss, die Wasch- und Elutionsfraktionen.

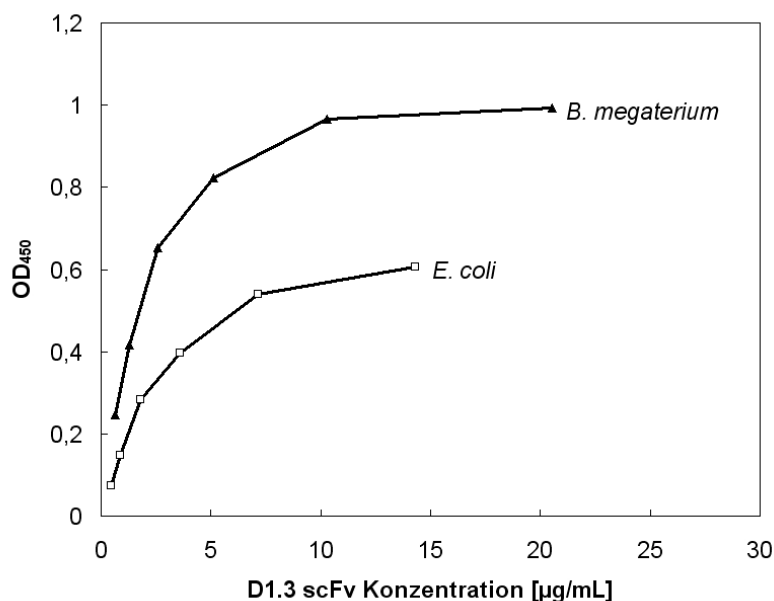


Abb. 22: ELISA des aufgereinigten D1.3 scFv aus *B. megaterium* und *E. coli*. Antigen: 1 µg/Vertiefung Lysozym. Der D1.3 scFv wurde detektiert durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG HRP (Fab spezifisch) Antikörper.

3.4 Produktion des LA13-IIE3 scFv in *B. megaterium* und *E. coli*

3.4.1 Produktion des LA13-IIE3 scFv in *B. megaterium*

Nach der erfolgreichen Produktion des D1.3 scFv in *B. megaterium* wurde untersucht, ob mittels *B. megaterium* und den optimierten Produktionsparametern andere scFv produziert werden konnten. Hierfür wurde der anti-CRP scFv LA13-IIE3 im 100 mL-Maßstab im Schüttelkolben für 24 h produziert. Proben des Überstandes wurden nach 0 h, 6 h und 24 h nach der Induktion mit Xylose entnommen und mittels SDS-PAGE, Immunoblot (Abb. 23) und ELISA (Abb. 24) analysiert. Nach 6 h Produktion konnte der LA13-IIE3 scFv mittels Immunoblot detektiert werden, wobei keine spezifische Aktivität mittels ELISA festgestellt werden konnte. 24 h nach der Induktion konnte sowohl die größte Menge an funktionellem scFv, als auch an gesamten scFv-Protein nachgewiesen werden, wobei jedoch eine stärkere Proteindegradation detektiert wurde. Der LA13-IIE3 scFv konnte erfolgreich mit *B. megaterium* produziert werden.

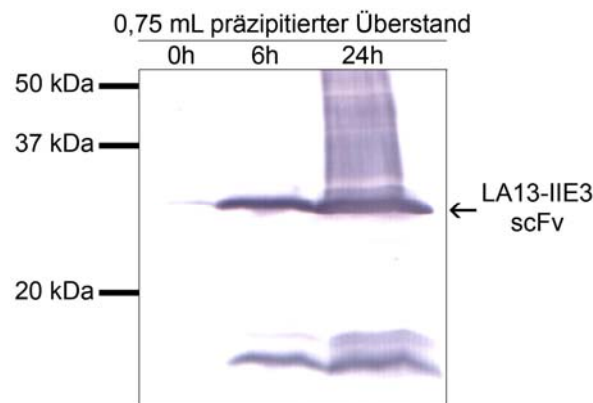


Abb. 23:Produktion des LA13-IIE3 scFv in *B. megaterium*: Immunoblot. Immunoblot des produzierten LA13-IIE3 scFv. Der scFv wurden aus je 0,75 mL Kulturüberstand nach 0 h, 6 h und 24 h Produktion im 100 mL-Maßstab (Schüttelkolben) mit Ammoniumsulfat präzipitiert und mit einer reduzierenden SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG AP (Fc spezifisch) Antikörper.

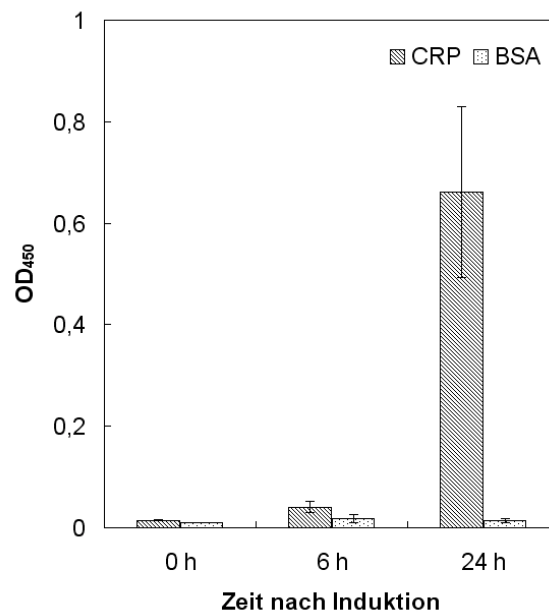


Abb. 24:Produktion des LA13-IIE3 scFv in *B. megaterium*: ELISA. Die Produktion von funktionellen LA13-IIE3 scFv wurde mittels eines ELISA mit je 50 µL Kulturüberstand nach 0 h, 6h und 24 h Produktion im 100 mL-Maßstab analysiert Die Daten stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen dar. Antigen: 100 ng/Vertiefung CRP oder 100 ng/Vertiefung BSA (Kontrolle). Der LA13-IIE3 scFv wurde detektiert durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG HRP (Fab spezifisch) Antikörper.

3.4.2 Vergleich der Produktion des LA13-IIE3 scFv in *B. megaterium* und *E. coli*

Um die Produktion des LA13-IIE3 scFv in *B. megaterium* mit dem etablierten Produktionsorganismus *E. coli* zu vergleichen, wurde der LA13-IIE3 scFv im 3x 100 mL- bzw. 300 mL-Maßstab im Schüttelkolben in *B. megaterium* und *E. coli* produziert. Die Aufreinigung erfolgte mittels IMAC. Die scFv-Ausbeuten wurden mittels SDS-PAGE densitometrisch bestimmt. Es konnten 390 µg/L scFv aus dem Kulturüberstand von *B. megaterium* und 550 µg/L scFv aus dem Periplasma und Kulturüberstand von *E. coli* aufgereinigt werden. Die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE (Abb. 25, 27) und Immunoblot überprüft (Abb. 26, 28).

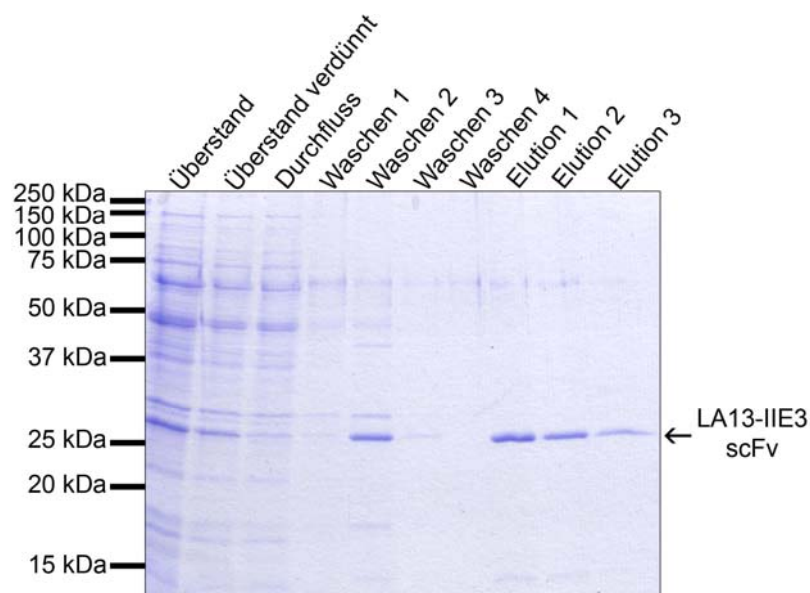


Abb. 25: Aufreinigung des LA13-IIE3 scFv mittels IMAC aus *B. megaterium*-Kulturüberstand: SDS-PAGE. Reduzierende SDS-PAGE (12 %) der LA13-IIE3 scFv-Aufreinigung aus mit Ammoniumsulfat präzipitiertem Überstand der *B. megaterium*-Produktion. Aufgetragen wurden der präzipitierte Überstand, der mit Bindepuffer 1:3 verdünnte präzipitierte Überstand, der Durchfluss, die Wasch- und die Elutionsfraktionen.

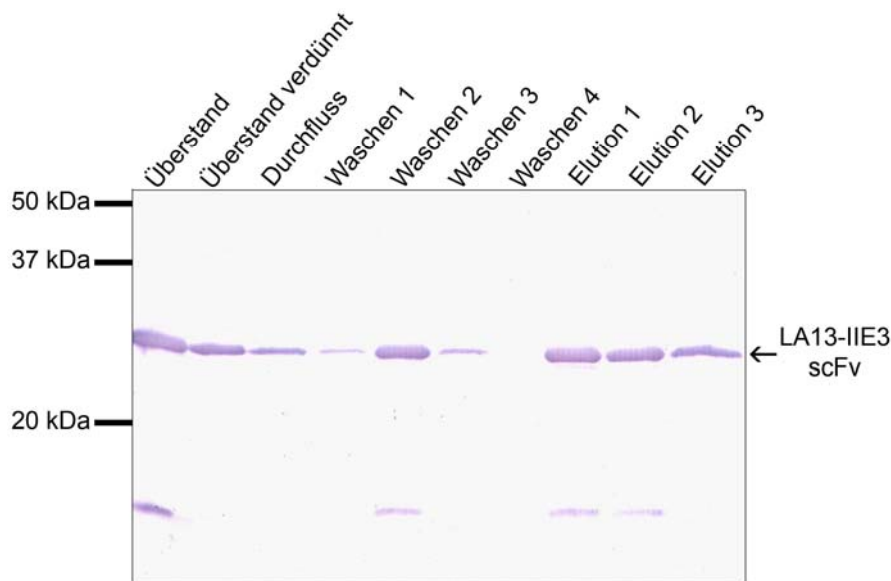


Abb. 26: Aufreinigung des LA13-IIE3 scFv mittels IMAC aus *B. megaterium*-Kulturüberstand:

Immunoblot. Immunoblot der LA13-IIE3 scFv-Aufreinigung aus mit Ammoniumsulfat präzipitiertem Überstand der *B. megaterium*-Produktion. Aufgetragen wurden der präzipitierte Überstand, der mit Bindepuffer 1:3 verdünnte präzipitierte Überstand, der Durchfluss, die Wasch- und die Elutionsfraktionen. Die Proben wurden mit einer reduzierenden SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Maus anti-His₆ und Ziege anti-Maus IgG AP (Fab spezifisch) Antikörper.

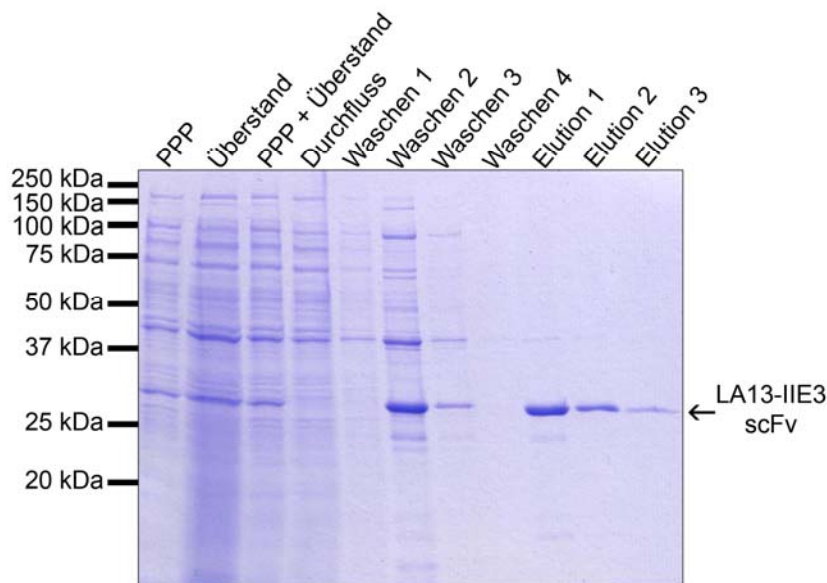


Abb. 27: Aufreinigung des LA13-IIE3 scFv mittels IMAC aus *E. coli*-Periplasma und -Kulturüberstand: SDS-PAGE. Reduzierende SDS-PAGE (12 %) der LA13-IIE3 scFv-Aufreinigung aus der Periplasmapräparation und dem mit Ammoniumsulfat präzipitiertem Überstand der *E. coli*-Produktion. Aufgetragen wurden die Periplasmapräparation (PPP), der präzipitierte Überstand, die PPP mit dem präzipitierten Überstand, der Durchfluss, die Wasch- und die Elutionsfraktionen.

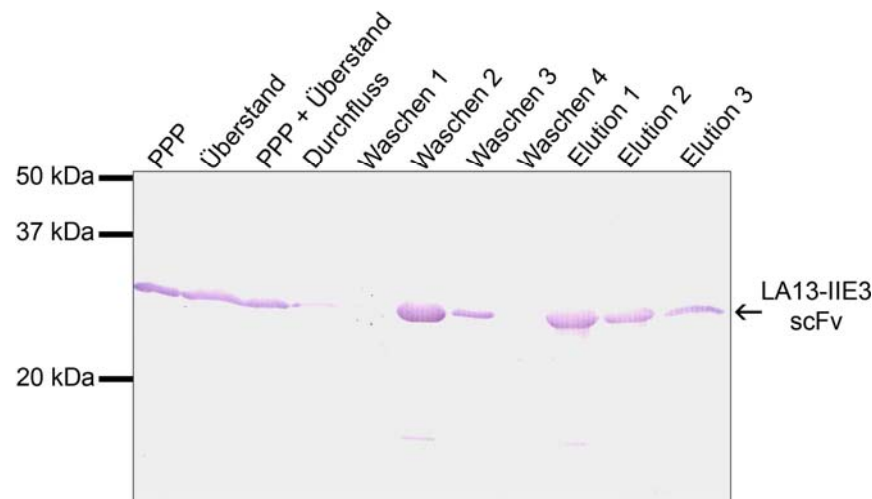


Abb. 28: Aufreinigung des LA13-IIE3 scFv mittels IMAC aus *E. coli*-Periplasma und -Kulturüberstand: Immunoblot. Immunoblot der LA13-IIE3 scFv-Aufreinigung aus der Periplasmapräparation und dem mit Ammoniumsulfat präzipitiertem Überstand der *E. coli*-Produktion. Aufgetragen wurden die Periplasmapräparation (PPP), der präzipitierte Überstand, die PPP mit dem präzipitierten Überstand, der Durchfluss, die Wasch- und die Elutionsfraktionen. Die Proben wurden mit einer reduzierenden SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG AP (Fab spezifisch) Antikörper.

In beiden Fällen konnte der scFv nahezu ohne Verunreinigungen aufgereinigt werden, wobei geringe Abbauprodukte detektiert wurden. Die spezifische Aktivität des in beiden Wirtsbakterien produzierten LA13-IIE3 scFv wurden mittels Titrations-ELISA auf CRP (Abb. 29) verglichen. Die spezifische Aktivität des in *B. megaterium* produzierten LA13-IIE3 scFv war höher als die des in *E. coli* produzierten scFv. Zwar konnte die größere Menge an LA13-IIE3 scFv aus dem Periplasma und den Kulturüberstand von *E. coli* aufgereinigt werden, der in *B. megaterium* produzierte scFv zeigte jedoch eine bessere spezifische Aktivität.

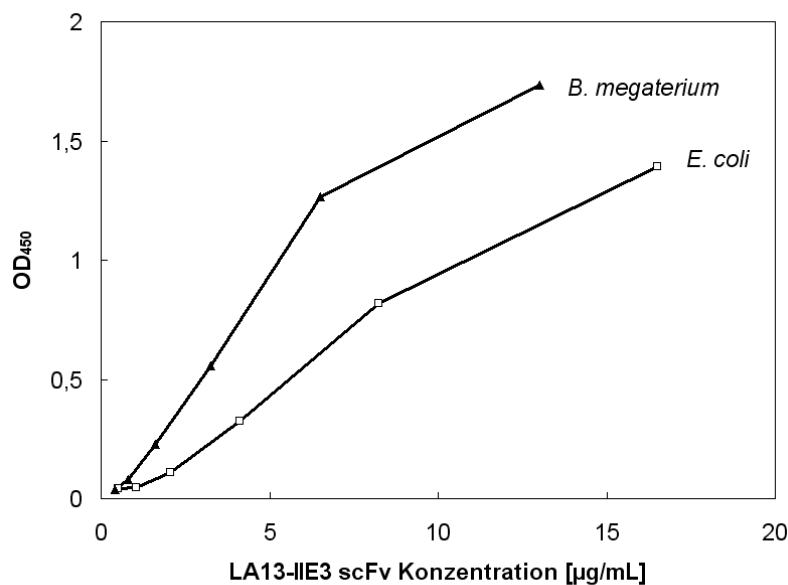


Abb. 29:ELISA des aufgereinigten LA13-IIIE3 scFv aus *B. megaterium* und *E. coli*. Antigen: 100 ng/Vertiefung CRP. Der LA13-IIIE3 scFv wurde detektiert durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG HRP (Fab spezifisch) Antikörper.

3.5 Produktion des D1.3 scFab Δ C in *B. megaterium* und *E. coli*

3.5.1 Produktion des D1.3 scFab Δ C in *B. megaterium*

Nach erfolgreicher Produktion von zwei verschiedenen scFv-Fragmenten in *B. megaterium* wurde untersucht, ob mittels *B. megaterium* komplexere Antikörperformate produzieren werden können. Hierfür wurde der anti-Lysozym Antikörper D1.3, der schon im scFv-Format in *B. megaterium* produziert werden konnte, im scFab Δ C-Format (Hust *et al.*, 2007) im 100 mL-Maßstab im Schüttelkolben mit den optimierten Produktionsparametern produziert. Proben des Überstandes wurden nach 0 h, 6 h und 24 h Produktion entnommen und mittels SDS-PAGE, Immunoblot (Abb. 30A) und ELISA (Abb. 30B) analysiert. Der D1.3 scFab Δ C konnte 6 h nach der Induktion mittels Immunoblot detektiert werden, wobei keine spezifische Aktivität mittels ELISA festgestellt werden konnte. Nach 24 h konnte funktioneller scFab Δ C auch mittels ELISA nachgewiesen werden,

wobei aber eine leichte Proteindegradation detektiert wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass der D1.3 scFab Δ C erfolgreich in *B. megaterium* produziert werden konnte.

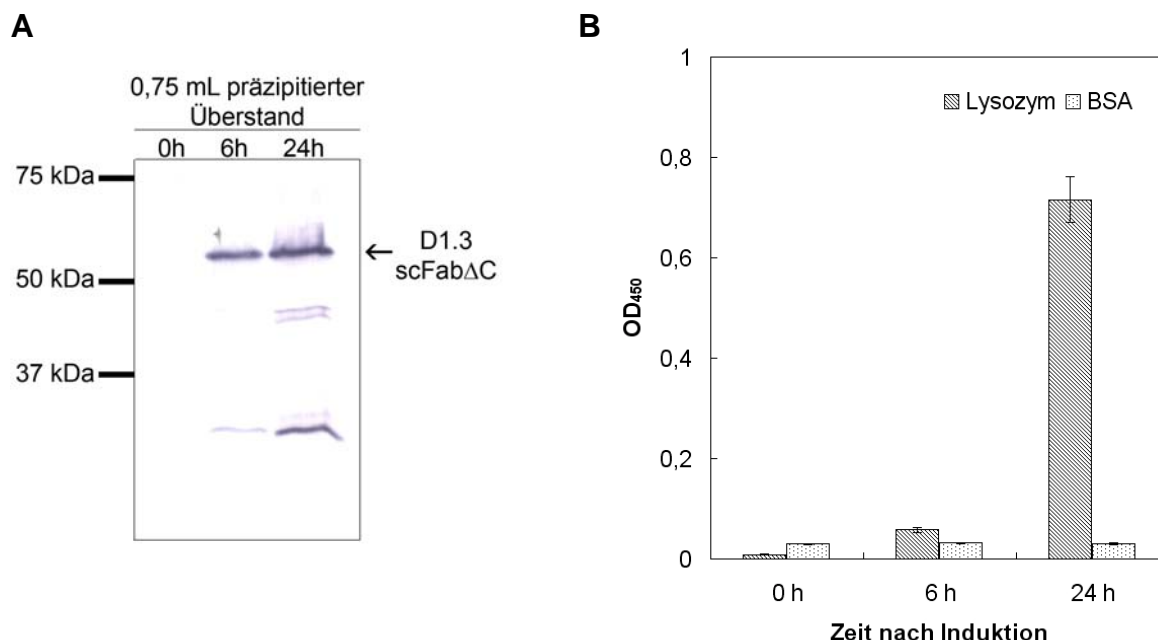


Abb. 30: Produktion des D1.3 scFab Δ C in *B. megaterium*: **A:** Immunoblot des produzierten D1.3 scFab Δ C. Der scFab wurde aus je 0,75 mL Kulturüberstand nach 0 h, 6 h und 24 h Produktion im 100 mL-Maßstab (Schüttelkolben) mit Ammoniumsulfat präzipitiert und mit einer reduzierenden SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG AP (Fc spezifisch) Antikörper. **B:** Die Produktion von funktionellen D1.3 scFab Δ C wurde mittels eines ELISA mit je 50 μ L Kulturüberstand nach 0 h, 6h und 24 h Produktion im 100 mL-Maßstab (Schüttelkolben) analysiert. Die Daten stellen die Mittelwerte von drei unabhängigen Kultivierungen dar. Antigen: 1 μ g/Vertiefung Lysozym oder 1 μ g/Vertiefung BSA (Kontrolle). Der D1.3 scFab Δ C wurde detektiert durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG HRP (Fc spezifisch) Antikörper.

3.5.2 Vergleich der Produktion des D1.3 scFab Δ C in *B. megaterium* und *E. coli*

Um die D1.3 scFab Δ C-Produktion in *B. megaterium* und *E. coli* zu vergleichen, wurde der D1.3 scFab Δ C im 6x 100 mL- bzw. 2x 300 mL-Maßstab im Schüttelkolben produziert. Für die Expression in *B. megaterium* wurden die für den D1.3 scFv optimierten Produktionsparameter angewendet. Die Aufreinigung aus

dem präzipitierten Überstand bzw. dem Periplasma und dem präzipitierten Überstand erfolgte mittels IMAC. Die scFab Δ C-Ausbeuten nach der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE densitometrisch bestimmt. Mit *B. megaterium* als Produktionswirt konnten 3,5 μ g/L D1.3 scFab Δ C aufgereinigt werden, mit *E. coli* 9,5 μ g/L. Die Analyse der Aufreinigung erfolgte mittels SDS-PAGE (Abb. 31, 33) und Immunoblot (Abb. 32, 34).

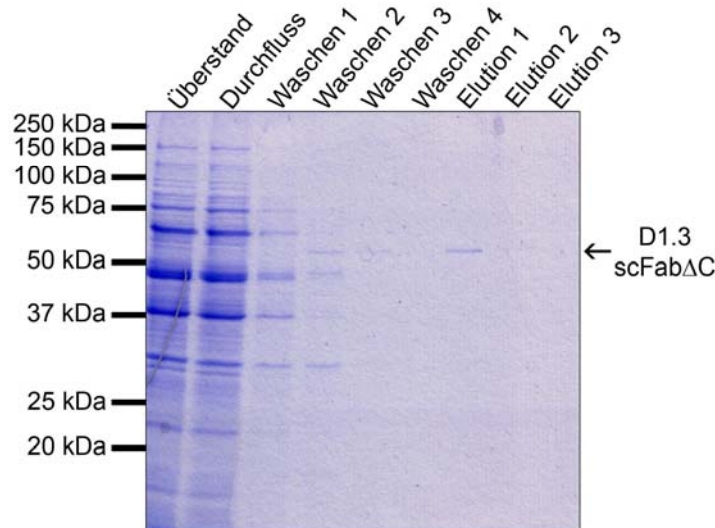


Abb. 31: Aufreinigung des D1.3 scFab Δ C mittels IMAC aus *B. megaterium*-Kulturüberstand:

SDS-PAGE. Reduzierende SDS-PAGE (12 %) der D1.3 scFab Δ C-Aufreinigung aus mit Ammoniumsulfat präzipitiertem Überstand der *B. megaterium*-Produktion. Aufgetragen wurden der präzipitierte Überstand, der Durchfluss, die Wasch- und die Elutionsfraktionen.

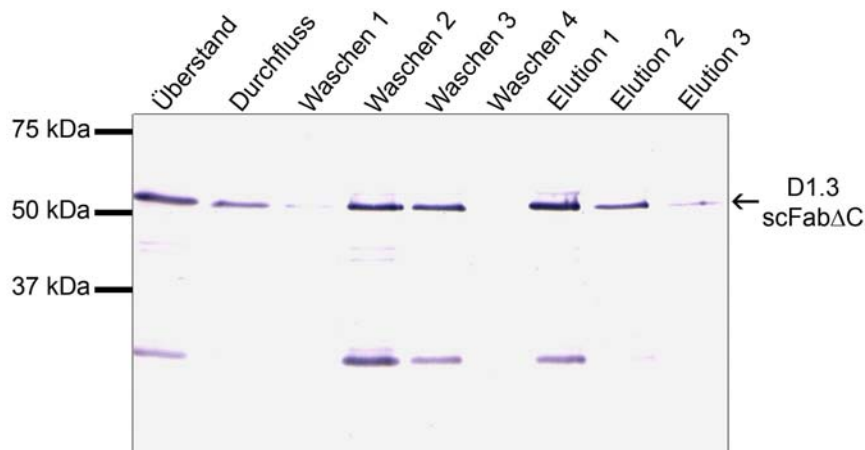


Abb. 32: Aufreinigung des D1.3 scFab Δ C mittels IMAC aus *B. megaterium*-Kulturüberstand:

Immunoblot. Immunoblot der D1.3 scFab Δ C-Aufreinigung aus mit Ammoniumsulfat präzipitiertem Überstand der *B. megaterium*-Produktion. Aufgetragen wurden der präzipitierte Überstand, der Durchfluss, die Wasch- und die Elutionsfraktionen. Die Proben wurden mit einer reduzierenden SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG AP (Fc spezifisch) Antikörper.

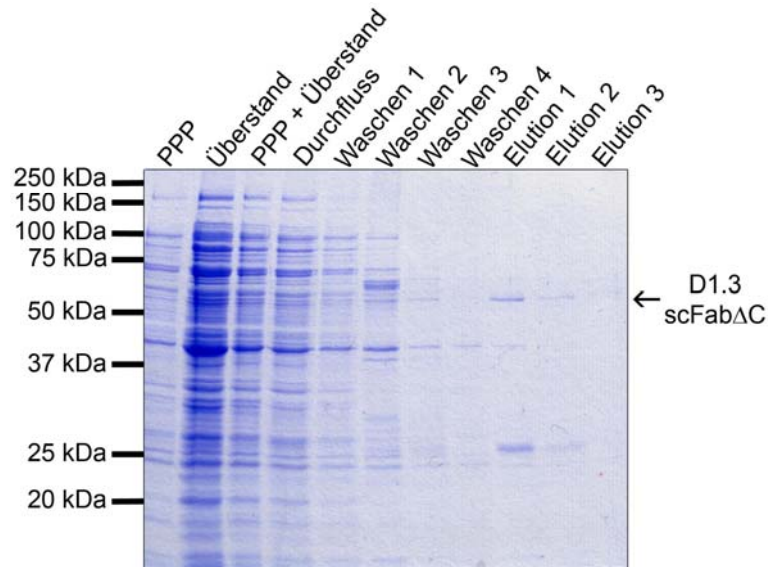


Abb. 33: Aufreinigung des D1.3 scFab Δ C mittels IMAC aus *E. coli*-Periplasma und -Kulturüberstand: SDS-PAGE. Reduzierende SDS-PAGE (12 %) der D1.3 scFab Δ C-Aufreinigung aus der Periplasmapräparation und dem mit Ammoniumsulfat präzipitiertem Überstand der *E. coli*-Produktion. Aufgetragen wurden die Periplasmapräparation (PPP), der präzipitierte Überstand, die PPP mit dem präzipitierten Überstand, der Durchfluss, die Wasch- und die Elutionsfraktionen.

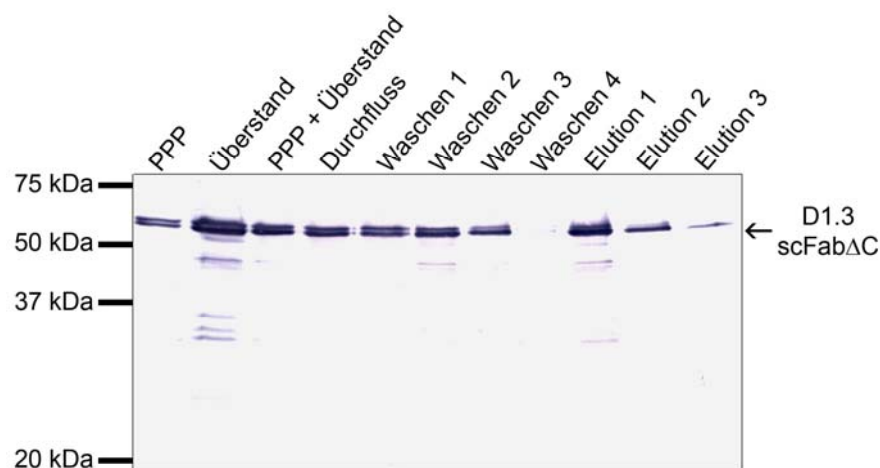


Abb. 34: Aufreinigung des D1.3 scFab Δ C mittels IMAC aus *E. coli*-Periplasma und -Kulturüberstand: Immunoblot. Immunoblot der D1.3 scFab Δ C-Aufreinigung aus der Periplasmapräparation und dem mit Ammoniumsulfat präzipitiertem Überstand der *E. coli*-Produktion. Aufgetragen wurden die Periplasmapräparation (PPP), der präzipitierte Überstand, die PPP mit dem präzipitierten Überstand, der Durchfluss, die Wasch- und die Elutionsfraktionen. Die Proben wurden mit einer reduzierenden SDS-PAGE (12 %) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG AP (Fc spezifisch) Antikörper.

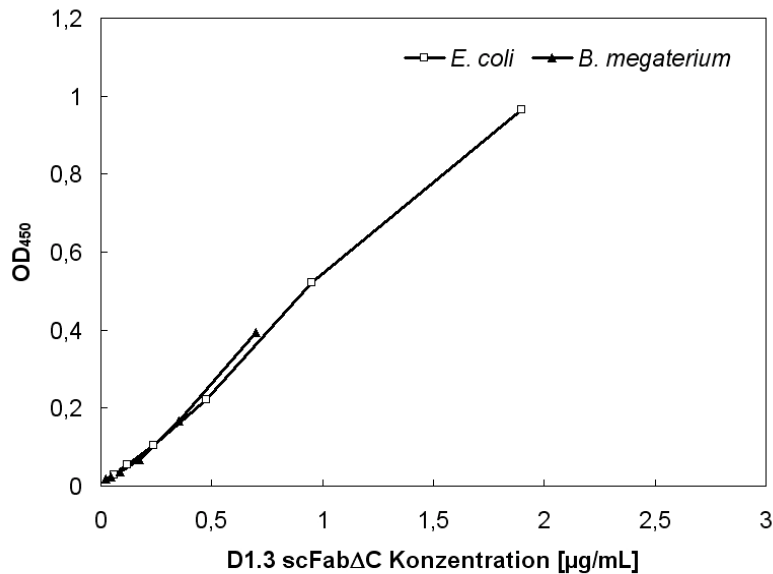


Abb. 35: ELISA des aufgereinigten D1.3 scFabΔC aus *B. megaterium* und *E. coli*. Antigen: 1 µg/Vertiefung Lysozym. Der D1.3 scFabΔC wurde detektiert durch Maus anti-His₅ und Ziege anti-Maus IgG HRP (Fc spezifisch) Antikörper.

Der scFabΔC konnte aus *B. megaterium*-Kulturüberstand ohne Verunreinigungen aufgereinigt werden, während bei der Aufreinigung aus der *E. coli*-Produktion leichte Verunreinigungen nachgewiesen werden konnten. Die Doppelbande im Immunoblot bei der Aufreinigung des *E. coli*-Materials ist möglicherweise auf Lyse der Zellen zurückzuführen, bei der der scFabΔC mit Signalpeptid freigesetzt wurde. Außerdem wurden in beiden Fällen Abbauprodukte detektiert. Die spezifische Aktivität des D1.3 scFabΔC wurde mittels Titrations-ELISA (Abb. 35) analysiert und war für beide Produktionssysteme identisch, wobei mit *E. coli* als Produktionswirt mehr scFabΔC produziert werden konnte. Die Reinheit des aufgereinigten Proteins war aber bei dem in *B. megaterium* produzierten Material größer.

4 Diskussion

Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente sind wichtige Werkzeuge für die Forschung, Diagnostik und Therapie. Das gramnegative Bakterium *E. coli* ist ein etablierter Produzent von Antikörperfragmenten. In *E. coli* produzierte Antikörperfragmente werden in den meisten Fällen in den periplasmatischen Raum sekretiert, der durch die äußere Membran begrenzt ist (Skerra & Plückthun, 1988). Im oxidierenden Milieu des periplasmatischen Raums können Antikörperfragmente korrekt gefaltet werden. Das reduzierende Milieu des Cytoplasmas ist dagegen meistens ungeeignet für die korrekte Faltung von Antikörperfragmenten (Plückthun, 1991). In manchen Fällen werden Antikörperfragmente zusätzlich auch ins umgebende Medium freigesetzt (Plückthun, 1991). Das grampositive Bakterium *B. megaterium* besitzt keine äußere Membran. So können rekombinante Proteine direkt ins Medium sekretiert und aus diesem aufgereinigt werden (Malten *et al.*, 2006, Biedendieck *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit sollten rekombinante Antikörperfragmente in *B. megaterium* sekretorisch produziert und aufgereinigt werden. Hierfür wurde der *B. megaterium*-Expressionsvektor pHIS1525 (Malten *et al.*, 2006) modifiziert.

4.1 Konstruktion der *B. megaterium*-Expressionsvektoren

Für die Klonierung und Expression von Antikörperfragmentgenen wurde der *B. megaterium*-Basisvektor pEJBmopSplipA mit einem Xylose-induzierbaren Promotorsystem (Rygus *et al.*, 1991) konstruiert. Die Gene, die den anti-Lysozym D1.3 scFv, den anti-CRP LA13-IIE3 scFv und den anti-Lysozym D1.3 scFab Δ C kodieren, wurden in den Basisvektor pEJBmopSplipA in *E. coli* kloniert. Da der *xylA*-Promotor des *B. megaterium*-Expressionsvektors in *E. coli* nicht reprimiert wurde (persönliche Mitteilung A. Roth, AG Jahn), war bei diesen Klonierungen eine Kotransformation mit den *E. coli*-Vektor pMMEc4 (Jordan *et al.*, 2007), der das Gen des Repressorproteins XylR unter der Kontrolle eines Arabinosepromotors trägt, notwendig. Das *xylR*-Gen auf den *B. megaterium*-

Expressionsvektor wurde wahrscheinlich nur von *B. megaterium* exprimiert. Die Klonierung der scFv-Gene konnte durch Koexpression des *xyIR*-Gens mit Hilfe des *E. coli*-Vektors pMMEc4 problemlos erfolgen. Bei der Klonierung des D1.3 scFab Δ C-Gens traten jedoch sehr häufig Deletionen im 5'-Bereich auf, die zu Leserasterverschiebungen führten. Eine Klonierung von Genen noch komplexerer Antikörperformate, wie das D1.3 sclgG Δ C-Gen, das die komplette leichte und schwere Immunglobulinkette als einzelsträngiges Fusionskonstrukt kodiert, war in den Vektor pEJBmopSplipA in *E. coli* überhaupt nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Der *xyIA*-Promotor war trotz kontinuierlicher *xyIR*-Expression nicht vollständig reprimiert (persönliche Mitteilung S. Stammen, AG Jahn), was möglicherweise auf bisher nicht identifizierte, genetische Regulationselemente von *E. coli* zurückzuführen ist. Je größer und komplexer Antikörperfragmente sind, um so toxischer sind sie für Bakterienzellen. Aus diesem Grund konnten die scFv-Gene trotz nicht vollständig reprimierten Promotors kloniert werden, während bei der Klonierung des D1.3 scFab Δ C- und D1.3 sclgG Δ C-Gens Mutationen auftraten.

4.2 Optimierung der Parameter für die D1.3 scFv-Produktion in *B. megaterium*

Der anti-Lysozym Antikörper D1.3 (Ward *et al.*, 1989, Skerra, 1994, Kirsch *et al.*, 2005) wurde als Modell für die Produktion von Antikörperfragmenten in *B. megaterium* im scFv-Format eingesetzt. Die optimalen Parameter für die Produktion von Antikörperfragmenten in *B. megaterium* wurden mit Hilfe dieses scFvs ermittelt. Die größte Ausbeute an funktionellem D1.3 scFv konnte bei einer Produktionstemperatur von 37 °C bis 43 °C und einer 24 h-Produktion in TB-Medium erzielt werden. Diese Parameter unterschieden sich von den optimalen Parametern für die Antikörperproduktion in *E. coli*, *B. subtilis* und *B. brevis*. Die Produktion von Antikörperfragmenten in *E. coli* findet bei Temperaturen zwischen 22 °C und 37 °C und einer Produktionsdauer von 2,5 h bis 20 h statt (Dübel *et al.*, 1992, Skerra, 1994, Schier *et al.*, 1996, Corisdeo & Wang, 2004, Kirsch *et al.*, 2005, Hust *et al.*, 2007). Für die Antikörperproduktion in *B. subtilis* wird eine Produktionstemperatur von 37 °C und eine Expressionsdauer von 5 h bis 8 h

verwendet, wohingegen Antikörper in *B. brevis* bei 30 °C für 3 Tage produziert werden (Inoue *et al.*, 1997, Wu *et al.*, 1998, Wu *et al.*, 2002, Shiroza *et al.*, 2003). Bei allen genannten Beispielen wurden reichhaltige Medien verwendet.

Die optimalen Parameter für die Produktion von Antikörperfragmenten in *B. megaterium* wichen ebenfalls von den Parametern ab, die für die Produktion von anderen rekombinanten, sekretierten Proteinen in diesem Bakterium beschrieben wurden. Für die Produktion und Sekretion der Dextransucrase DsrS aus *Leuconostoc mesenteroides* war das semidefinierte Medium A5 bei einer Temperatur von 37 °C und einer Produktionsdauer von 6 h bis 9 h optimal (Malten *et al.*, 2005a). Die Herstellung der Levansucrase aus *Lactobacillus reuteri* in *B. megaterium* erfolgte bei 37 °C in LB-Medium für 6 h (Biedendieck *et al.*, 2007). Bei der Produktion der Penicillin G-Amidase wurde ebenfalls LB-Medium und eine Temperatur von 37 °C verwendet. Die Produktionsdauer betrug hingegen 24 h (Yang *et al.*, 2006).

Bei keinem der beschriebenen Beispiele wurden Temperaturen höher als 37 °C für die Produktion von Proteinen verwendet. Wu *et al.* (1998) konnten die Menge an sekretierten scFv-Fragment in *B. subtilis* durch die Überproduktion von intrazellulären Hitze-Schock-Chaperonen erhöhen, da weniger scFv-Fragmente unlöslich im Cytoplasma vorlagen. Für die relativ hohe optimale *B. megaterium*-Produktionstemperatur von 37 °C – 43 °C könnte ein Hitze-Schock-Effekt, der zu einer gesteigerten Chaperonproduktion führt, verantwortlich sein. Eine höhere Zelldichte bei 37 °C – 43°C als bei den anderen untersuchten Temperaturen kann nicht eine Ursache sein, da bei der Produktion bei 30 °C die höchste Zelldichte gemessen wurde.

Die optimale Produktionsdauer für Antikörperfragmente in den genannten Beispielen betrug mehrere Stunden bis Tage. Bei der Produktion von sekretierten Proteinen in *B. megaterium* waren Expressionszeiträume von 6 h bis 24 h optimal. Diesem entspricht die optimale Produktionsdauer für den D1.3 scFv in *B. megaterium* von 24 h.

Bei der Produktion von Antikörperfragmenten in den verschiedenen beschriebenen prokaryotischen Organismen wurden reichhaltige Medien verwendet, während bei der Produktion von anderen extrazellulären Proteinen in *B. megaterium* aber neben LB-Medium auch das semidefinierte Medium A5 optimal war. Bei Verwendung dieses Mediums konnte kein funktioneller D1.3 scFv

in *B. megaterium* produziert werden. Für die Antikörperfragmentproduktion in *B. megaterium* war das sehr proteinreiche und Glycerin-haltige Medium TB notwendig. Dieses Medium ist außerdem wie das Minimalmedium M9 und das Medium A5 gepuffert. Eine höhere Zelldichte kann nicht für die bessere Eignung des TB-Mediums für die Produktion von Antikörperfragmenten verantwortlich sein, da mit 2xTY-Medium nur wenig geringere Zelldichten erreicht wurden. Warum sich dieses Medium besser für die Produktion von Antikörperfragmenten in *B. megaterium* eignet als die anderen untersuchten Medien muss noch analysiert werden.

Bei der Optimierung der D1.3 scFv-Produktion in *B. megaterium* wurden Abbauprodukte nachgewiesen, obwohl der Protease-defiziente Stamm MS941 verwendet wurde. Dies kann auf eine Restproteaseaktivität von 1,4 % verglichen mit dem Wildtyp zurückzuführen sein (Wittchen & Meinhardt, 1995). Eine weitere Ursache könnten intrazelluläre Proteasen sein, die durch Zelllyse ins Medium freigesetzt wurden. Bei der Produktion der Dextranucrase und Levansucrase in *B. megaterium* wurden ebenfalls Abbauprodukte detektiert (Malten *et al.*, 2005a, Biedendieck *et al.*, 2007).

Weiterhin wurde ein Unterschied zwischen der totalen und der funktionellen Menge an sekretierten D1.3 scFv nachgewiesen. Dies zeigt, dass nicht alle sekretierten scFv-Fragmente im Kulturüberstand funktionell waren. Bei Produktionen über 48 h wurde z. B. die maximale Menge an funktionellem scFv nach 18 h bzw. 24 h detektiert. Eine längere Produktion führte zu einer Reduktion der Menge an funktionellem D1.3 scFv, während die Gesamtmenge an scFv konstant blieb oder weiter stieg. Dies könnte einerseits auf eine Überlastung des Faltungsapparates zurückzuführen sein. Andererseits könnte der D1.3 scFv über längere Zeiträume im Medium bei höheren Produktionstemperaturen nicht stabil sein.

4.3 Produktion von scFv-Fragmenten in *B. megaterium*

Um die Produktion des D1.3 scFv in *B. megaterium* mit der in dem etablierten Antikörperproduktionswirt *E. coli* zu vergleichen, wurde dieser scFv in beiden Organismen im Schüttelkolben produziert. Aus dem Kulturüberstand der *B. megaterium*-Produktion konnten 410 µg/L scFv mittels IMAC aufgereinigt werden, während aus dem Periplasma und dem Kulturüberstand von *E. coli* nur 290 µg/L scFv aufgereinigt werden konnten. In den Elutionsfraktionen der *B. megaterium*-Aufreinigung wurden weniger Verunreinigungen nachgewiesen. Außerdem zeigten die scFvs, die in *B. megaterium* produziert wurden, im ELISA eine höhere spezifische Aktivität. Somit konnte der D1.3 scFv aus dem *B. megaterium*-Kulturüberstand mit einer höheren Ausbeute, Reinheit und spezifischen Aktivität aufgereinigt werden als aus *E. coli*-Periplasma und -Überstand.

Nach der erfolgreichen Produktion des D1.3 scFv in *B. megaterium* wurde untersucht, ob andere scFv-Fragmente in *B. megaterium* hergestellt werden können. Hierfür wurde der anti-CRP LA13-IIE3 scFv im Schüttelkolbenmaßstab produziert. Nach 6 h Produktion konnte der LA13-IIE3 scFv im Kulturüberstand nachgewiesen werden, wobei noch keine funktionellen scFv mittels ELISA detektiert werden konnten. 24 h nach der Induktion der Produktion wurde jedoch funktioneller LA13-IIE3 scFv detektiert. Mittels Immunoblot wurden, wie bei der Produktion des D1.3 scFv, Abbauprodukte nachgewiesen. Mit dem LA13-IIE3 scFv konnte ein zweites scFv-Fragment erfolgreich in *B. megaterium* produziert werden.

Um die Produktion des LA13-IIE3 scFv in *B. megaterium* und *E. coli* zu vergleichen, wurde der LA13-IIE3 scFv in beiden Organismen im Schüttelkolben produziert. Aus dem Kulturüberstand der *B. megaterium*-Produktion konnten 390 µg/L scFv mittels IMAC aufgereinigt werden, wohingegen 550 µg/L LA13-IIE3 scFv aus dem Periplasma und Kulturüberstand von *E. coli* aufgereinigt werden konnten. In beiden Fällen wurden Abbauprodukte der gleichen Größe detektiert, so dass vermutet werden kann, dass der LA13-IIE3 scFv eine Protease-Schnittstelle besitzt.

Die Ausbeuten an LA13-IIE3 scFv und D1.3 scFv waren vergleichbar, wobei diesmal aus *E. coli*-Periplasma und -Überstand mehr scFv aufgereinigt werden konnte als aus *B. megaterium*-Überstand. Der *B. megaterium*-Produktionsstamm ist aber nicht optimiert verglichen mit der langjährigen Optimierung von verschiedenen *E. coli*- und *B. subtilis*-Stämmen. Mit *E. coli* als Produktionswirt konnten bis zu 2 g/L eines Fab-Fragments produziert werden (Carter *et al.*, 1992). Mit einem optimierten *B. subtilis*-Stamm gelang eine scFv-Produktion von bis zu 15 mg/L (Wu *et al.*, 2002). 10 mg/L eines scFv-Fragments und 100 mg/L eines Fab-Fragments konnten in *B. brevis* hergestellt werden (Inoue *et al.*, 1997, Shiroza *et al.*, 2003). Die produzierte Menge unterscheidet sich aber sehr stark bei verschiedenen Antikörperfragmenten, da jedes Fragment eine andere Aminosäuresequenz besitzt und somit individuelle Eigenschaften hinsichtlich der Faltung und Produzierbarkeit aufweist.

Der LA13-IIE3 scFv und der D1.3 scFv, die aus dem Kulturüberstand der *B. megaterium*-Produktion aufgereinigt wurden, hatten eine höhere spezifische Aktivität als die scFvs, die aus der *E. coli*-Produktion aufgereinigt wurden. Dies könnte auf eine größere Menge an funktionellen scFv in den Elutionsfraktionen der *B. megaterium*-Produktion zurückzuführen sein, da z. B. weniger Aggregate vorlagen. Eine weitere Erklärung könnte das Vorhandensein von scFv-Dimeren sein, weil diese durch einen Aviditätseffekt eine bessere Antigenbindung zeigen als monomere Antikörperfragmente (Hust *et al.*, 2007).

Nach der Produktion von zwei verschiedenen scFv-Fragmenten sollten weitere scFvs in *B. megaterium* hergestellt werden. Der anti-MUC1 IIB6 scFv (Tolékis, 2003) und der anti-CRP TOB5-D4 scFv (L. Al-Halabi, AG Dübel) konnten aber nicht erfolgreich in *B. megaterium* produziert werden (Daten nicht gezeigt). Mittels Immunoblot wurden scFv-Fragmente der richtigen Molekülmasse nachgewiesen, wobei jedoch mittels ELISA keine funktionellen scFvs detektiert werden konnten, was auf eine Fehlfaltung der Proteine schließen lässt. Die erfolgreich produzierten scFv-Fragmente D1.3 und LA13-IIE3 besitzen eine variable Domäne der leichten Kette vom Typ κ , während die variable Domäne der leichten Kette des IIB6 scFv und TOB5-D4 scFv vom Typ λ ist. Weiterhin verfügen der D1.3 scFv und der LA13-IIE3 scFv über einen Glycin-Serin-Peptidlinker (Huston *et al.*, 1988), während der IIB6 scFv und TOB5-D4 scFv einen YoI-Peptidlinker (Dübel *et al.*, 1992) besitzen. Einer dieser zwei Unterschiede könnte für die Fehlfaltung des IIB6

scFv und des TOB5-D4 scFv in *B. megaterium* verantwortlich sein. Im Gegensatz zu der Produktion in *B. megaterium* wurden beide scFvs funktionell in *E. coli* produziert (Toleikis, 2003, persönliche Mitteilung L. Al-Halabi, AG Dübel), so dass es sich hier um ein spezifisches Problem in *B. megaterium* handelt.

4.4 Produktion des D1.3 scFab Δ C in *B. megaterium*

Nach der Produktion von scFv-Fragmenten in *B. megaterium* wurde untersucht, ob in diesem Bakterium auch komplexere Antikörperfragmente hergestellt werden können. Hierzu wurde der Antikörper D1.3 im scFab Δ C-Format (Hust *et al.*, 2007) in *B. megaterium* im Schüttelkolben produziert. Nach 24 h Produktion konnte funktioneller D1.3 scFab Δ C nachgewiesen werden. Wie bei den scFv-Fragmenten wurden auch hier Abbauprodukte detektiert.

Bei dem LA13-II-E3 scFv und D1.3 scFab Δ C war eine Produktionsdauer von 24 h notwendig, um funktionelle Antikörperfragmente mittels ELISA nachweisen zu können, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die für den D1.3 scFv optimierte Expressionsdauer von 24 h auch für andere Antikörperfragmente geeignet ist.

Mittels *B. megaterium* konnte der Antikörper D1.3 nicht nur im scFv-Format sondern auch im größeren und komplexeren scFab Δ C-Format erfolgreich produziert werden.

Die Produktion des D1.3 scFab Δ C in *B. megaterium* und *E. coli* wurde im Schüttelkolbenmaßstab verglichen. Aus dem *B. megaterium*-Kulturüberstand konnten 3,5 μ g/L D1.3 scFab Δ C aufgereinigt werden, während aus dem *E. coli*-Periplasma und -Kulturüberstand 9,5 μ g/L D1.3 scFab Δ C aufgereinigt wurden. Der D1.3 scFab Δ C aus dem Überstand der *B. megaterium*-Produktion konnte ohne Verunreinigungen aufgereinigt werden. Bei den Elutionsfraktionen der *E. coli*-Produktion wurden hingegen leichte Verunreinigungen detektiert. In beiden Fällen wurden Abbauprodukte nachgewiesen, die wahrscheinlich wieder auf intrazelluläre Proteasen zurückzuführen sind, die durch Zelllyse ins Medium freigesetzt wurden. Eine starke Zelllyse konnte bei der *E. coli*-Produktion nachgewiesen werden, da hier eine D1.3 scFab Δ C-Doppelbande im Kulturüberstand und in der

Periplasmapräparation mittels Immunoblot detektiert wurde. Diese Doppelbande entspricht den D1.3 scFab Δ C mit und ohne Signalpeptid. Proteine mit Signalpeptid können nur durch Zelllyse ins umgebene Medium gelangen, da das Signalpeptid während des Transportes durch die Zellmembran abgespalten wird (Pugsley, 1993). Die starke Zelllyse ist auf die höhere Toxizität des D1.3 scFab Δ C verglichen mit dem D1.3 scFv zurückzuführen. Dies spiegelt sich auch in den Ausbeuten der produzierten Antikörperfragmente wieder. Der D1.3 scFv konnte in beiden Organismen in wesentlich höheren Konzentrationen produziert werden als der D1.3 scFab Δ C. Je größer und komplexer Antikörperfragmente sind, desto schlechter werden sie insbesondere in bakteriellen Expressionssystemen produziert (Plückthun, 1990).

Die spezifische Aktivität der aufgereinigten Antikörperfragmente war bei den beiden Produktionen identisch. Mit *E. coli* als Produktionswirt konnte zwar mehr scFab Δ C produziert werden, die Reinheit des aufgereinigten Proteins war aber bei dem in *B. megaterium* produzierten Material größer.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in *B. megaterium* produzierten Ausbeuten an Antikörperfragmenten vergleichbar mit den Ausbeuten aus *E. coli*-Produktionen sind. Weiterhin konnten Antikörperfragmente aus *B. megaterium*-Produktionen im Regelfall mit weniger Verunreinigungen aufgereinigt werden, als Antikörperfragmente aus *E. coli*-Produktionen. Außerdem wurde für die in *B. megaterium* produzierten scFv-Fragmente eine höhere spezifische Aktivität nachgewiesen als für die in *E. coli* produzierten scFv-Fragmente. *B. megaterium* stellt als Produktionswirt für Antikörperfragmente eine Alternative zu *E. coli* dar, die aber noch ein großes Optimierungspotential aufweist.

4.5 Ausblick

In *B. megaterium* konnten erstmals erfolgreich zwei scFv-Fragmente und ein scFab Δ C-Fragment produziert werden. Damit wurden erste Grundlagen geliefert *B. megaterium* als alternatives, prokaryotisches Antikörperproduktionssystem für *E. coli* zu etablieren. Um das *B. megaterium*-Expressionssystem weiter zu verbessern, sollte entweder der in *E. coli* nicht reprimierte *xylA*-Promotor

hinsichtlich der Reprimierbarkeit optimiert oder ein anderes Promotorsystem etabliert werden, um die Klonierung von Antikörpergenen in den *B. megaterium*-Expressionsvektor zu erleichtern. Zusätzlich sollte der Einfluss verschiedener Signalpeptide auf die sekretorische Produktion von Antikörperfragmenten untersucht werden. Für eine weitere Optimierung der Produktionsparameter sollten der Induktionszeitpunkt und die Konzentration des Induktors überprüft werden. Weiterhin sollte die Koexpression von Chaperonen zur Verbesserung der Faltung von Antikörperfragmenten untersucht werden, da in *B. subtilis* mit der Koexpression des extrazellulären Chaperons PrsA Ausbeutesteigerungen erzielt werden konnten (Wu *et al.*, 1998). Außerdem sollten andere Antikörperformate in *B. megaterium* produziert werden, die, wie z. B. der sclgG, wesentlich größer und komplexer sind oder aus zwei Peptidketten bestehen, wie z. B. das Fab-Fragment.

5 Zusammenfassung

Rekombinante Antikörper und Antikörperfragmente sind wichtige Hilfsmittel für die Forschung, Diagnostik und Therapie. Seit zwanzig Jahren wird *E. coli* für die Produktion rekombinanter Antikörperfragmente eingesetzt. Als gramnegatives Bakterium mit einer äußeren Membran weist es jedoch nur eine eingeschränkte Sekretionskapazität für heterologe Proteine auf. Alternative Produktionssysteme, wie grampositive Bakterien, versprechen aufgrund der fehlenden äußeren Membran Vorteile bei der sekretorischen Produktion von Antikörperfragmenten.

In dieser Arbeit wurde das grampositive Bakterium *B. megaterium* für die Produktion und Sekretion von Antikörperfragmenten untersucht. Hierfür wurde der Einfluss von Parametern wie Temperatur, Medium und Produktionsdauer auf die Produktion des anti-Lysozym D1.3 scFv überprüft. Eine Produktionstemperatur von 37 °C – 43 °C, eine Produktionsdauer von 24 h und die Verwendung des reichhaltigen TB-Mediums waren optimal für die scFv-Produktion. Mit den optimierten Produktionsparametern konnten der D1.3 scFv und der anti-CRP LA13-IIE3 scFv in *B. megaterium* produziert und anschließend aufgereinigt werden. Die Ausbeuten aus den *B. megaterium*- und *E. coli*-Produktionen waren vergleichbar. Die in *B. megaterium* produzierten scFvs zeigten jedoch eine höhere spezifische Aktivität.

Der Antikörper D1.3 konnte auch im neuartigen scFab Δ C-Format in *B. megaterium* produziert werden. Die aus der *B. megaterium*-Produktion erzielte Ausbeute war nur wenig geringer als die Ausbeute aus der *E. coli*-Produktion. Die spezifische Aktivität der aufgereinigten scFab Δ C-Fragmente war jedoch identisch.

In *B. megaterium* konnte erstmals neben scFv-Fragmenten auch ein scFab Δ C-Fragment erfolgreich sekretorisch produziert werden. Damit stellt *B. megaterium* ein alternatives, prokaryotisches Produktionssystem für Antikörperfragmente mit viel Entwicklungspotential dar.

5 Summary

Recombinant antibodies and antibody fragments are important tools for research, diagnostic and therapy. Since twenty years *E. coli* have been used for the production of recombinant antibody fragments. As a Gram-negative bacterium with an outer membrane it possesses a limited secretory capacity for heterologous proteins. Alternative production systems like Gram-positive bacteria have advantages concerning the secretory production of antibody fragments, because they are lacking an outer membrane.

In this work the Gram-positive bacterium *B. megaterium* was tested for the production and secretion of antibody fragments. For this purpose the influence of the parameters temperature, medium and production time on the production of the anti-lysozyme D1.3 scFv were investigated. A production temperature of 37 °C – 43 °C, a production time of 24 h and the usage of the rich TB medium were optimal for scFv production. Using these optimized production parameters the D1.3 scFv and the anti-CRP LA13-IIE3 scFv were produced in *B. megaterium* and purified afterwards. The scFv yields of the *B. megaterium* and *E. coli* productions were comparable, but the scFvs produced in *B. megaterium* showed a higher specific activity.

The antibody D1.3 was also produced in the novel scFab Δ C format in *B. megaterium*. The yield of the *B. megaterium* production was little lower than the yield of the *E. coli* production. The specific activity of the purified scFab Δ C fragments was identical.

For the first time scFv fragments and a scFab Δ C fragment were successfully produced and secreted in *B. megaterium*. For this reason *B. megaterium* is an alternative, prokaryotic production system for antibody fragments with a great potential for further improvement.

6 Literaturverzeichnis

- Abrams, C., Deng, Y. J., Steiner, B., O'Toole, T., Shattil, S. J. (1994). Determinants of specificity of a baculovirus-expressed antibody Fab fragment that binds selectively to the activated form of integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem* **269**, 18781 – 18788.
- Ames, R. S., Tornetta, M. A., Deen, K., Jones, C. S., Swift, A. M., Ganguly, S. (1995). Conversion of murine Fabs isolated from a combinatorial phage display library to full length immunoglobulins. *J Immunol Methods* **184**, 177 – 186.
- Arndt, K. M., Müller, K. M., Plückthun, A. (1998). Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. *Biochemistry* **37**, 12918 – 12926.
- Barg, H., Malten, M., Jahn, M., Jahn, D. (2005). Protein and vitamin production in *Bacillus megaterium*. In Barredo J. L. (Hrsg.). *Methods in Biotechnology 18: Microbial Processes and Products*, 165 – 183., Humana Press Inc., Totowa, USA.
- Biedendieck, R., Beine, R., Gamer, M., Jordan, E., Buchholz, K., Seibel, J., Dijkhuizen, L., Malten, M., Jahn, D. (2007). Export, purification, and activities of affinity tagged *Lactobacillus reuteri* levansucrase produced by *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**, 1062 – 1073.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S., Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423 – 426.
- Bird, R. E., Walker, B. W. (1991). Single chain antibody variable regions. *Trends Biotech* **9**, 132 – 137.

- Breitling, F., Dübel, S. (1997). *Rekombinante Antikörper*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Bruyns, A. M., De Jaeger, G., De Neve, M., De Wilde, C., Van Montagu, M., Depicker, A. (1996). Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties. *FEBS Lett* **386**, 5 – 10.
- Burger, S., Tatge, H., Hofmann, F., Genth, H., Just, I., Gerhard, R. (2003). Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A using the *Bacillus megaterium* system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **307**, 584 – 588.
- Carayannopoulos, L., Max, E. E., Capra, J. D. (1994). Recombinant human IgA expressed in insect cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 8348 – 8352.
- Carter, P., Kelley, R. F., Rodrigues, M. L., Snedecor, B., Covarrubias, M., Velligan, M. D., Wong, W. L. T., Rowland, A. M., Kotts, C. E., Carver, M. E., Yang, M., Bourell, J. H., Shepard, H. M., Henner, D. (1992). High level *Escherichia coli* expression and purification of a bivalent humanized antibody fragment. *Bio/Technology* **10**, 163 – 167.
- Corisdeo, S., Wang, B. (2004). Functional expression and display of an antibody Fab fragment in *Escherichia coli*: study of vector designs and culture conditions. *Protein Expression and Purification* **34**, 270 – 279.
- Cunningham, B. A., Pflumm, M. N., Rutishauser, U., Edelman, G. M. (1969). Subgroups of amino acid sequences in the variable region of immunoglobulin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci USA* **64**, 997 – 1003.
- Dahl, M. K., Degenkolb, J., Hillen, W. (1994). Transcription of the *xyI* operon is controlled in *Bacillus subtilis* by tandem overlapping operators spaced by four base-pairs. *J Mol Biol* **243**, 413 – 424.

- Dahl, M. K., Schmiedel, D., Hillen, W. (1995). Glucose and glucose-6-phosphate interaction with Xyl repressor proteins from *Bacillus* spp. may contribute to regulation of xylose utilization. *Journal of Bacteriology* **177**, 5467 – 5472.
- Davis, G. T., Bedzyk, W. D., Voss, E. W., Jacobs, T. W. (1991). Single chain antibody (SCA) encoding genes: one-step construction and expression in eukaryotic cells. *Biotechnology NY* **9**, 165 – 169.
- Deutscher, J., Küster, E., Bergstedt, U., Charrier, V., Hillen, W. (1995). Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **15**, 1049 – 1053.
- Dübel, S., Breitling, F., Klewinghaus, I., Little, M. (1992). Regulated secretion and purification of recombinant antibodies in *E. coli*. *Cell Biophysics* **21**, 69 – 79.
- Edelman, G. M. (1973). Antikörperstrukturen und molekulare Immunologie (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* **24**, 1083 – 1096.
- Edelman, G. M., Poulik, M. D. (1961). Studies on structural units of the γ -globulins. *J Exp Med* **113**, 861 – 884.
- Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Gall, W. E., Gottlieb, P. D., Rutishauser, U., Waxdal, M. J. (1969). The covalent structure of an entire γ G immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* **63**, 78 – 85.
- Edqvist, J., Keranen, S., Penttilä, M., Straby, K. B., Knowles, J. K. (1991). Production of functional IgM Fab fragments by *Saccharomyces cerevisia*. *J Biotechnol* **20**, 291 – 300.
- Firek, S., Draper, J., Owen, M. R., Gandeche, A., Cockburn, B., Whitlam, G. C. (1993). Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures. *Plant Mol Biol* **23**, 861 – 879.

- Gottlieb, P. D., Cunningham, B. A., Waxdal, M. J., Konigsberg, W. H., Edelman, G. M. (1968). Variable regions of heavy and light polypeptide chains of the same γ G-immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* **61**, 168 – 175.
- Harris, L. J., Larson, S. B., Hasel, K. W., Day, J., Greenwood, A., McPherson, A. (1992). The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma. *Nature* **360**, 369 – 372.
- Honda, K., Nakamura, K., Nishiguchi, M., Yamane, K. (1993). Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* gene encoding a homolog of the 54-kilodalton subunit of mammalian signal recognition particle and *Escherichia coli* Ffh. *Journal of Bacteriology* **175**, 4885 – 4894.
- Horwitz, A. H., Chang, C. P., Better, M., Hellstrom, K. E., Robinson, R. R. (1988). Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 8678 – 8682.
- Hu, P., Glasky, M. S., Yun, A., Alauddin, M. M., Hornick, J. L., Khawli, L. A., Epstein, A. L. (1995). A human-mouse chimeric Lym-1 monoclonal antibody with specificity for human lymphomas expressed in a baculovirus system. *Hum Antibodies Hybridomas* **6**, 57 – 67.
- Hust, M., Jostock, T., Menzel, C., Voedisch, B., Mohr, A., Brenneis, M., Kirsch, M. I., Meier, D., Dübel, S. (2007). Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnology* **7**:14.
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M., Novotny, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Brucoleri, R. E., Haber, E., Crea, R., Oppermann, H. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **85**, 5879 – 5883.

- Iliades, P., Dougan, D. A., Oddie, G. W., Metzger, D. W., Hudson, P. J., Kortt, A. A. (1998). Single-chain Fv of anti-idiotypic 11-1G10 antibody interacts with antibody NC41 single-chain Fv with a higher affinity than the affinity for the interaction of the parent Fab fragments. *Journal of Protein Chemistry* **17**, 245 – 254.
- Inbar, D., Hochman, J., Givol, D. (1972). Localization of antibody-combining sites within the variable portions of heavy and light chains. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**, 2659 – 2662.
- Inoue, Y., Ohta, T., Tada, H., Iwasa, S., Udaka, S., Yamagata H. (1997). Efficient production of a functional mouse/human chimeric Fab' against human urokinase-type plasminogen activator by *Bacillus brevis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**, 487 – 492.
- Janeway, C. A., Traves, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002). *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Jordan, E., Hust, M., Roth, A., Biedendieck, R., Schirrmann, T., Jahn, D., Dübel, S. (2007). Production of recombinant antibody fragments in *Bacillus megaterium*. *Microbial Cell Factories* **6**:2.
- Jost, C. R., Titus, J. A., Kurucz, I., Segal, D. M. (1996). A single-chain bispecific Fv2 molecule produced in mammalian cells redirects lysis by activated CTL. *Mol Immunol* **33**, 211 – 219.
- Jostock, T., Vanhove, M., Brepoels, E., Van Gool, R., Daukandt, M., Wehnert, A., Van Hegelsom, R., Dransfield, D., Sexton, D., Devlin, M., Ley, A., Müllberg, J. (2004). Rapid generation of functional human IgG antibodies derived from Fab-on-phage display libraries. *Journal of Immunological Methods* **289**, 65 – 80.

- Karamanou, S., Vrontou, E., Sianidis, G., Baud, C., Roos, T., Kuhn, A., Politou, A. S., Economou, A. (1999). A molecular switch in SecA protein couples ATP hydrolysis to protein translocation. *Molecular Microbiology* **34**, 1133 – 1145.
- Keranen, S., Penttilä, M. (1995). Production of recombinant proteins in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Curr Opin Biotechnol* **6**, 534 – 547.
- Kim, J. Y. (2003). Overproduction and secretion of *Bacillus circulans* endo- β -1,3-1,4-glucanase gene (*bglBC1*) in *B. subtilis* and *B. megaterium*. *Biotechnology Letters* **25**, 1445 – 1449.
- Kirsch, M., Zaman, M., Meier, D., Dübel, S., Hust, M. (2005). Parameters affecting the display of antibodies on phage. *Journal of Immunological Methods* **301**, 173 – 185.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495 – 497.
- Kortt, A. A., La, M., Oddie, G. W., Guen, C. L., Burns, J. E., Pearce, L. A., Atwell, J. L., McCoy, A. J., Howlett, G. J., Metzger, D. W., Webster, R. G., Hudson, P. J. (1997). Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer. *Protein Engineering* **10**, 423 – 433.
- Kramer, K., Fiedler, M., Skerra, A., Hock, B. (2002). A generic strategy for subcloning antibody variable regions from the scFv phage display vector pCANTAB 5 E into pASK85 permits the economical production of F_{ab} fragments and leads to improved recombinant immunoglobulin stability. *Biosensors & Bioelectronics* **17**, 305 – 313.
- Kretzschmar, T., Aoustin, L., Zingel, O., Marangi, M., Vonach, B., Towbin, H., Geiser, M. (1996). High-level expression in insect cells and purification of secreted monomeric single-chain Fv antibodies. *J Immunol Methods* **195**, 93 – 101.

- Kurita, K., Honda, K., Suzuma, S., Takamatsu, H., Nakamura, K., Yamane, K. (1996). Identification of a region of *Bacillus subtilis* Ffh, a homologue of mammalian SRP54 protein, that is essential for binding to small cytoplasmic RNA. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 13140 – 13146.
- Lämmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 – 685.
- Le Gall, F., Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G., Little, M. (1999). Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on cell binding. *FEBS Letters* **453**, 164 – 168.
- Li, H., Sethuraman, N., Stadheim, T. A., Zha, D., Prinz, B., Ballew, N., Bobrowicz, P., Choi, B., Cook, W. J., Cukan, M., Houston-Cummings, N. R., Davidson, R., Gong, B., Hamilton, S. R., Hoopes, J. P., Jiang, Y., Kim, N., Mansfield, R., Nett, J. H., Rios, S., Strawbridge, R., Wildt, S., Gerngross, T. U. (2006). Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology* **24**, 210 – 215.
- Mack, M., Riethmüller, G., Kufer, P. (1995). A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 7021 – 7025.
- Malten, M., Hollmann, R., Deckwer, W. D., Jahn, D. (2005a). Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase DsrS in *Bacillus megaterium*. *Biotechnology and Bioengineering* **89**, 206 – 218.
- Malten, M., Nahrstedt, H., Meinhardt, F., Jahn, D. (2005b). Coexpression of the type I signal peptidase gene *sipM* increases recombinant protein production und export in *Bacillus megaterium* MS941. *Biotechnology and Bioengineering* **91**, 616 – 621.

- Malten, M., Biedendieck, R., Gamer, M., Drews, A., Stammen, S., Buchholz, K., Dijkhuizen, L., Jahn, D. (2006). A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one-step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 1677 – 1679.
- Meijer, W. J., de Jong, A., Bea, G., Wisman, A., Tjalsma, H., Venema, G., Bron, S., Van Dijk, J. M. (1995). The endogenous *Bacillus subtilis* (natto) plasmids pTA1015 and pTA1040 contain signal peptidase-encoding genes: identification of a new structural module on cryptic plasmids. *Mol Microbiol* **17**, 621 – 631.
- Nahrstedt, H., Wittchen, K. D., Rachman, M. A., Meinhardt, F. (2004). Identification and functional characterization of a type I signal peptidase gene of *Bacillus megaterium* DSM319. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 243 – 249.
- Nakamura, K., Yahagi, S., Yamazaki, T., Yamane, K. (1999). *Bacillus subtilis* histone-like protein, HBSu, is an integral component of a SRP-like particle that can bind the *Alu* domain of small cytoplasmic RNA. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 13569 – 13576.
- Nesbit, M., Fu, Z. F., McDonald-Smith, J., Steplewski, Z., Curtis, P. J. (1992). Production of a functional monoclonal antibody recognizing human colorectal carcinoma cells from a baculovirus expression system. *J Immunol Methods* **151**, 201 – 208.
- Nyyssonen, E., Penttilä, M., Harkki, A., Saloheimo, A., Knowles, J. K., Keranen, S. (1993). Efficient production of antibody fragments by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology NY* **11**, 591 – 595.

- Oguro, A., Kakeshita, H., Honda, K., Takamatsu, H., Nakamura, K., Yamane, K. (1995). *srb*: a *Bacillus subtilis* gene encoding a homologue of the alpha-subunit of the mammalian signal recognition particle receptor. *DNA Res* **2**, 95 – 100.
- Plückthun, A. (1990). Antibodies from *Escherichia coli*. *Nature* **347**, 497 – 498.
- Plückthun, A. (1991). Antibody engineering: advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. *Bio/Technology* **9**, 545 – 551.
- Porter, R. R. (1959). The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* **73**, 119 – 126.
- Promega (1996). *Protocols and Applications Guide*. Promega Corporation, Madison, USA.
- Pugsley, A. P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiological Reviews* **57**, 50 – 108.
- Raux, E., Lanois, A., Warren, M. J., Rambach, A., Thermes, C. (1998). Cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthesis: identification and characterization of a *Bacillus megaterium* *cobI* operon. *Biochem. J.* **335**, 159 – 166.
- Ridder, R., Schmitz, R., Legay, F., Gram, H. (1995). Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **13**, 255 – 260.
- Roskams, J., Rodgers, L. (Hrsg.) (2002). *Lab Ref: A handbook of recipes, reagents, and other reference tools for use at the bench*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

- Ruiz, C., Blanco, A., Pastor, F. I. J., Diaz, P. (2002). Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. *FEMS Microbiology Letters* **217**, 263 – 267.
- Rygus, T., Hillen, W. (1991). Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl Microbiol Biotechnol* **35**, 594 – 599.
- Rygus, T., Scheler, A., Allmansberger, R., Hillen, W. (1991). Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the *Bacillus megaterium* encoded regulon for xylose utilization. *Arch Microbiol* **155**, 535 – 542.
- Rygus, T., Hillen, W. (1992). Catabolite repression of the *xyI* operon in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* **174**, 3049 – 3055.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463 – 5467.
- Schier, R., Bye, J., Apell, G., McCall, A., Adams, G. P., Malmqvist, M., Weiner, L. M., Marks, J. D. (1996). Isolation of high-affinity monomeric human anti-*c-erbB-2* single chain Fv using affinity-driven selection. *J Mol Biol* **255**, 28 – 43.
- Schmiedel, D., Kintrup, M., Küster, E., Hillen, W. (1997). Regulation of expression, genetic organization and substrate specificity of xylose uptake in *Bacillus megaterium*. *Molecular Microbiology* **23**, 1053 – 1062.
- Schouten, A., Roosien, J., van-Engelen, F. A., de Jong, G. A., Borst-Vrens, A. W., Zilverentant, J. F., Bosch, D., Stiekema, W. J., Gommers, F. J., Schots, A., Bakker, J. (1996). The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* **30**, 781 – 793.

- Shiroza, T., Shinozaki-Kuwahara, N., Hayakawa, M., Shibata, Y., Hashizume, T., Fukushima, K., Udaka, S., Abiko, Y. (2003). Production of a single-chain variable fraction capable of inhibiting the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase in *Bacillus brevis*: construction of a chimeric shuttle plasmid secreting its gene product. *Biochimica et Biophysica Acta* **1626**, 57 – 64.
- Simmons, L. C., Reilly, D., Klimowski, L., Raju, T. S., Meng, G., Sims, P., Hong, K., Shields, R. L., Damico, L. A., Rancatore, P., Yansura, D. G. (2002). Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies. *Journal of Immunological Methods* **263**, 133 – 147.
- Skerra, A., Plückthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin F_V fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038 -1041.
- Skerra, A. (1994). A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody F_{ab} fragments. *Gene* **141**, 79 – 84.
- Tjalsma, H., Noback, M. A., Bron, S., Venema, G., Yamane, K., Van Dijk, J. M. (1997). *Bacillus subtilis* contains four closely related type I signal peptidases with overlapping substrate specificities: constitutive and temporally controlled expression of different *sip* genes. *J Biol Chem* **272**, 25983 – 25992.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Van Roosmalen, M. L., Wiegert, T., Schumann, W., Broekhuizen, C. P., Quax, W., Venema, G., Bron, S., Van Dijk, J. M. (1998). Functional analysis of the secretory precursor processing machinery of *Bacillus subtilis*: identification of a eubacterial homolog of archaeal and eukaryotic signal peptidases. *Genes Dev* **12**, 2318 – 2331.

- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D. H., Braun, P. G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J. Y. F., Westers, H., Zanen, G., Quax, W. J., Kuipers, O. P., Brin, S., Hecker, M., Van Dijl, J. M. (2004). Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the „secrets“ of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 207 – 233.
- Toleikis, L. (2003). Rekombinante Antikörper gegen tumorassoziiertes MUC1. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Twyman, R. M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., Fischer, R. (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *TRENDS in Biotechnology* **21**, 570 – 578.
- Ueda, Y., Tsumoto, K., Watanabe, K., Kumagai, I. (1993). Synthesis and expression of a DNA encoding the Fv domain of an anti-lysozyme monoclonal antibody, HyHEL10, in *Streptomyces lividans*. *Gene* **129**, 129 – 134.
- Van der Wolk, J. P. W., de Wit, J. G., Driessen, A. J. M. (1997). The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *The EMBO Journal* **16**, 7297 – 7304.
- Van Wely, K. H. M., Swaving, J., Freudl, R., Driessen, A. J. M. (2001). Translocation of proteins across the cell envelope of gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 437 – 454.
- Vary, P. S. (1994). Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology* **140**, 1001 – 1013.
- Ward, E. S., Güssow, D., Griffiths, A. D., Jones, P. T., Winter, G. (1989). Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* **341**, 544 – 546.

- Wittchen, K. D., Meinhardt, F. (1995). Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**, 871 – 877.
- Wu, S. C., Ye, R., Wu, X. C., Ng, S. C., Wong, S. L. (1998). Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones. *Journal of Bacteriology* **180**, 2830 – 2835.
- Wu, S. C., Yeung, J. C., Duan, Y., Ye, R., Szarka, S. J., Habibi, H. R., Wong, S. L. (2002). Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3261 – 3269.
- Wu, T. T., Kabat, E. A. (1970). An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* **132**, 211 – 250.
- Wu, X. C., Ng, S. C., Near, R. I., Wong, W. L. (1993). Efficient production of a functional single-chain antidigoxin antibody via an engineered *Bacillus subtilis* expression-secretion system. *Biotechnology NY* **11**, 71 – 76.
- Yang, Y., Biedendieck, B., Wang, W., Gamer, M., Malten, M., Jahn, D., Deckwer, W. D. (2006). High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*. *Microbial Cell Factories* **5**:36.
- Yang, Y., Malten, M., Grote, A., Jahn, D., Deckwer, W. D. (2007). Codon optimized *Thermobifida fusca* hydrolase secreted by *Bacillus megaterium*. *Biotechnology and Bioengineering* **96**, 780 – 794.

7 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Dübel möchte ich mich für die Vergabe des sehr interessanten Promotions-Themas, sowie für die vielen wissenschaftlichen Hilfestellungen bedanken.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanke ich mich vielmals bei Prof. Dr. Jahn.

Prof. Dr. Dersch danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Michael Hust und Dr. Thomas Schirrmann danke ich für die intensive Betreuung und die Korrektur dieser Arbeit.

Bei Holger Thie, Torsten Rülker und Torsten Meyer bedanke ich mich ebenfalls für die Korrektur der Arbeit.

Rebekka Biedendieck und Marco Malten danke ich für die *Bacillus megaterium*-Einführung und die vielen Hilfestellungen.

Bei Laila Al-Halabi möchte ich mich für die Bereitstellung des LA13-IIE3 scFvs bedanken.

Großer Dank gilt auch meinen Arbeitskollegen des Instituts für Biochemie und Biotechnologie für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Für die vielen hilfreichen Diskussionsrunden und die nette Zusammenarbeit möchte ich mich bei meinen SFB-Kollegen bedanken.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meiner Mutter und Alexander Malik für ihr Verständnis, die fürsorgliche Unterstützung und ihren Glauben an mich.

Last but not least möchte ich mich bei Mia Jordan, Mika Jordan und Finn Ehrlich für die liebevolle moralische Unterstützung bedanken.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Eva Grazyna Jordan
Geburtsdatum	27.08.1979
Geburtsort	Gdingen (Polen)
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Schule

29.06.1999	Abitur am Gymnasium Am Fredenberg, Salzgitter, Note: 3,2
------------	---

Studium

10/1999 – 07/2004	Studium der Biologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
10/1999 – 10/2001	Grundstudium
01.10.2001	Vordiplom, Note: sehr gut
10/2001 – 07/2004	Hauptstudium, Schwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik, Zellbiologie Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie: „Gerichtete Evolution der Metallbinderegionen der Porphobilinogen- Synthase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> “
16.07.2004	Diplom-Biologin, Note: sehr gut

Promotion / Berufliche Tätigkeiten

09/2004 – heute	Promotion am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig: „Produktion rekombinanter Antikörperfragmente in <i>Bacillus megaterium</i> “
-----------------	--